



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

FABÍOLA TURIEL COSTA SILVA

Desvio de proporção de inativação do cromossomo X no diagnóstico de  
deficiência intelectual ligada ao X e câncer

Brasília

2018

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

FABÍOLA TURIEL COSTA SILVA

Desvio de proporção de inativação do cromossomo X no diagnóstico de  
deficiência intelectual ligada ao X e câncer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção de título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília

2018

FABÍOLA TURIEL COSTA SILVA

Desvio de proporção de inativação do cromossomo X no diagnóstico de  
deficiência intelectual ligada ao X e câncer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Animal do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade de  
Brasília como requisito parcial para a obtenção  
de título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Silviene Fabiana de Oliveira (Presidente)**

Universidade de Brasília (UnB)

**Dr. Marcio José Poças Fonseca**

Universidade de Brasília (UnB)

**Dra. Patrícia Natália Silva Moretti**

Universidade de Brasília (UnB)

**Dr. Rolando André Rios Villacis (Suplente)**

Universidade de Brasília (UnB)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Brasília por proporcionar a estrutura necessária para minha formação como bióloga na graduação e pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) por financiamento de projeto e de participação em congressos.

À minha orientadora Silviene pela confiança, ensinamentos, companheirismo e por me aceitar como integrante do laboratório desde o estágio técnico. Em seu laboratório amadureci como pessoa e profissional e você teve um papel essencial nisso.

À professora Juliana Mazzeu pela imensa e fundamental contribuição neste e demais trabalhos desenvolvidos no laboratório de Genética Humana do IB, além de seu grande trabalho desenvolvido com os pacientes HUB, juntamente com as médicas do ambulatório de Genética Clínica e equipe do laboratório de Genética da Faculdade de Ciências da Saúde, em especial Aluísio e Erica. Assim como à Dra. Íris Ferrari, por tantos anos de dedicação e por proporcionar a base para o desenvolvimento da área de genética humana no Centro-Oeste.

À parceria com o Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia Molecular da Universidade Católica de Brasília - Campus Asa Norte, pela execução do procedimento de genotipagem por eletroforese capilar.

À colaboração com as professoras Yara Muniz e Ilíada Rainha do Laboratório de Polimorfismos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina, pela concessão de amostras de pacientes com câncer.

Aos professores que contribuíram com a realização deste trabalho, Aline Pic-Taylor, Renato Caparroz e Nazaré Klautau. Aos colegas de laboratório que contribuíram diretamente para este trabalho Rafaela, Diana, Raphael, Heloísa e Brisa. Àqueles que foram grandes companheiros no nosso café sagrado do dia-a-dia, Larissa, Yasmin, Carlos, Nina, Gislane e Victor. Aos colegas mais experientes pelo aprendizado, Arcanjo, Carolina, Sabrina e Harumy. Aos tantos colegas do laboratório de Genética Humana, agradeço pela aprendizagem e amizade.

No âmbito pessoal agradeço primordialmente aos meus pais, Augusto e Dilene, por sempre me apoiarem e proporcionarem educação de qualidade, incentivo e amor. Não há palavras para

mensurar a contribuição de vocês na minha formação profissional e pessoal. Aos meus irmãos Renan e Simone e à minha família no meu amado Pará, obrigada pelo apoio.

Ao meu namorado Luciano, aos meus amigos que encontrei nas mais diversas trajetórias, em especial Débora e Clara, e ao meu filhote Sirius. Obrigada por me ajudarem a ser um ser humano melhor e me proporcionarem amor, equilíbrio e bem-estar emocional no decorrer deste trabalho.

A todos mencionados e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

*“Imagine that everything is completely known and that science has nothing more to discover: what a nightmare!”*

*(Theodosius Dobzhansky)*

## RESUMO

A inativação do cromossomo X é um evento de silenciamento epigenético que ocorre em todas as células somáticas de fêmeas de mamíferos, e tem como consequência a compensação de dose gênica. Uma vez que em humanos esta inativação é aleatória, desvios na proporção esperada de 50:50 podem aparecer por diversas razões, incluindo alterações cromossômicas e mutações pontuais. Desta forma, a análise de desvio de inativação poderia ser uma ferramenta na triagem de pacientes candidatos a análises moleculares mais complexas, auxiliando assim o processo de diagnóstico e aconselhamento genético. O objetivo geral deste trabalho foi investigar se esse desvio no padrão de inativação do cromossomo X pode ser um marcador molecular a ser utilizado em diagnóstico e aconselhamento genético de pacientes considerando dois exemplos, em dois capítulos: i) grupo caso de deficiência intelectual com heredograma sugestivo de herança ligada ao X (XLID); ii) grupo caso de câncer, dividido em duas abordagens – mulheres com histórico de câncer familiar e mulheres com diagnóstico de câncer de mama. Para estabelecer o padrão de inativação do cromossomo X, um STR no gene de Receptor de Andrógeno (AR) foi genotipado utilizando o ensaio AR. Além disso, foram buscadas CNVs (*CytoScan™ 750k Array, Thermo Fisher Scientific®*) para pacientes de XLID cujas mães apresentaram desvio. Na primeira abordagem, o grupo de mães de pacientes não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle (dados da literatura). Porém, a análise dos filhos afetados por CMA, assim como outros testes moleculares, revelaram alterações patogênicas em genes situados principalmente na região Xq28, ressaltando o papel dessa região no desenvolvimento do sistema nervoso. Outras alterações foram vistas, porém de significado incerto, não podendo assim elucidar o seu papel no quadro clínico e nos desvios observados. Na segunda abordagem, foi observada diferença estatística entre o grupo controle e o de mulheres com histórico de câncer familiar, porém não houve distinção de resultado entre os tipos de câncer observados. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo de mulheres com diagnóstico de câncer de mama. Estes resultados demonstram que a análise de inativação do cromossomo X não possui associação clara com XLID e câncer e que o seu papel no diagnóstico e aconselhamento genético é questionável, não sendo ainda a melhor alternativa para screening de famílias com pacientes afetados por essas patologias, pois requer estudos adicionais para utilização com melhor eficiência.

**Palavras-chave:** Inativação do cromossomo X, desvio de inativação do cromossomo X, deficiência intelectual ligada ao X, CNV, histórico de câncer familiar, câncer de mama, aconselhamento genético.

## ABSTRACT

X chromosome inactivation is an epigenetic silencing event that occurs in all somatic cells of mammalian females for gene dose compensation. Since this inactivation is random in humans, the expected proportion would be 50:50. However, skewed inactivation may appear for a variety of reasons, including chromosomal abnormalities and point mutations. Thus, identification of skewed X inactivation could be used as a tool in screening of candidate patients to undergo more complex molecular analyses, therefore assisting the process of diagnosis and genetic counselling. The main aim of this study was to investigate whether the skewed inactivation pattern may be considered a molecular marker to be used in diagnosis and genetic counselling considering two examples, in two chapters: i) case group of females potentially carriers of X-linked intellectual disability (XLID); ii) case group of cancer, divided into two approaches – females with family history of cancer and females diagnosed with breast cancer. To establish the inactivation pattern of the X chromosome, a STR on the Androgen Receptor (AR) gene was genotyped using the AR assay. In addition, CNVs (*CytoScan*<sup>™</sup> 750k Array, *Thermo Fisher Scientific*®) were assayed for XLID patients whose mothers presented skewed inactivation patterns. Considering the XLID group, no statistical difference was observed when compared to the control group (literature data). However, CNVs analyses, as well as other molecular tests, revealed pathogenic alterations in genes located mainly in the Xq28 region, emphasizing the role of this region in the nervous system development. Other variants were seen, but those were of uncertain significance, and therefore could not elucidate their role in clinical outcomes and skewed inactivation. In the cancer group, a statistical difference was observed between females with a family history of cancer and the control group, but there was no distinction when cancer types were analysed. There was no statistical difference between females diagnosed with breast cancer and the control group. These results demonstrate that skewed X inactivation has no clear association with XLID and cancer, and therefore its role in diagnosis and genetic counselling is questionable and cannot be considered yet the best alternative for screening of patients affected by those pathologies, since additional studies are required to establish its use with more efficiency.

**Keywords:** X chromosome inactivation, Skewed X inactivation, X-linked intellectual disability, CNVs, family history of cancer, breast cancer, genetic counselling.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

**Figura 1.** Ilustração comparando o XIC de humanos e camundongos, representados pelos domínios topologicamente associados (TADs - círculos ovalados laranjas), onde é possível observar que o locus humano apresenta menos componentes que o de camundongos, porém encontra-se expandido. O retângulo tracejado denota o locus Xce (X-controlling element) em camundongos, responsável pelo mecanismo de escolha do X a ser inativado. Setas abaixo de Xce indicam duplicações (SD) e inversões (I) que incluem o gene *Dmrtc1*. Genes codificadores de proteína estão ilustrados como setas brancas, indicando o sentido da transcrição. Genes de RNA não codificantes estão representados por setas coloridas (Adaptado de Peeters et al, 2016).....2

**Figura 2.** Modelo representativo das fases embrionárias associadas à inativação do cromossomo X em humano. A fase de duas células apresenta os dois cromossomos X ativos (XaXa). Posteriormente, a expressão de *XIST* é induzida e iniciada no estágio de 8 células, sendo que mais a frente este gene sofre upregulação e a inativação é iniciada (blastocisto primário (XaXa/i)). A inativação já se apresenta finalizada na implantação e o X ativo sofre upregulação para compensação de dose com cromossomos autossômicos (X2aXi) (Adaptado de Moreira de Mello et al., 2017).....3

**Figura 3.** O processo de inativação do X é iniciado com a expressão do gene *XIST*, cujo produto é um RNA não-codificante que reveste o cromossomo a ser silenciado. Tal revestimento também recruta marcas histônicas, garantindo o caráter estável da inativação (imagem adaptada de Avner & Heard, 2001).....4

### Capítulo I

**Figura I.1** Representação de 106 genes do cromossomo X associados com XLID, os quais tiveram as suas patogenicidades classificadas de acordo com o tipo e número de mutações reportados no OMIM em “confirmados, necessitam replicação e questionáveis”. Os classificados em “necessitam replicação” possuem poucas mutações reportadas em poucos pacientes ou em famílias específicas e necessitam replicações para serem confirmados. Aqueles classificados em “questionáveis” são genes cujas mutações apresentam relatos contraditórios

na literatura, e portanto têm o seu papel monogênico na manifestação desses fenótipos como questionável (Adaptado de Piton et al., 2013).....12

**Figura I.2.** Representatividade aproximada das regiões brasileiras na amostra de mulheres com filhos afetados por deficiência intelectual ligada ao X do Hospital Universitário de Brasília (HUB).....15

**Figura I.3.** Fluxograma representativo do protocolo de análise de inativação do cromossomo X, ilustrando o sítio de corte da enzima HhaI próximo ao STR (CAG)<sub>n</sub> do gene AR. O material digerido e o não digerido são amplificados por PCR. Então, a eletroforese é conduzida tanto em gel de agarose, para confirmar a eficiência da digestão, como em capilar, para detecção de fragmento (imagem adaptada de Comertpay et al., 2014).....16

**Figura I.4.** Fotografia de gel de agarose de amostras de DNA digeridas e não digeridas em ensaio do gene AR para determinação de inativação do cromossomo X. O primeiro poço indica uma amostra de DNA digerida de um indivíduo do sexo masculino, onde nenhuma banda de amplificação foi verificada, o que garantiu a eficiência da digestão. O poço seguinte (2) indica a mesma amostra de DNA sem digestão, na qual é esperada e verificada a presença de banda de amplificação. Os demais poços (3 a 12) são correspondentes a amostras de DNA de mulheres digeridas e não digeridas, onde é esperada a visualização de banda mesmo após a digestão, devido a presença de um cromossomo inativo que sofre amplificação.....17

**Figura I.5.** Eletroferograma com picos de Relative Fluorescence Units (RFU) referentes aos fragmentos obtidos através de eletroforese capilar antes e após digestão e amplificação do STR do gene AR. A) Eletroferograma referentes a amostra de DNA não digerida, com fragmentos correspondentes aos alelos (setas). B) Mesma amostra de DNA após digestão, onde um dos fragmentos sofreu maior redução de RFU, e conseqüentemente, o cromossomo correspondente estava ativo com maior frequência. A proporção de inativação nesta amostra é de 83:17. Imagens geradas utilizando o software Coffalyser.NET™ .....18

**Figura I.6.** Distribuição da frequência de mulheres (n=33) com filho afetado por deficiência intelectual com heredograma sugestivo de herança ligada ao X de acordo com seus relativos padrões de inativação divididos em bins de 5%.....21

**Figura I.7.** Representação da região Xp11.23. Em amarelo o cluster gênico da família SSX e genes que o circundam. Na sua porção distal, a região com polimorfismos descritos. Na região

proximal, as variantes patogênicas descritas na literatura e a encontrada em XB1. As posições em Mb são referentes ao genoma hg18 (imagem adaptada de Froyen et al, 2007).....25

## **Capítulo II**

**Figura II.1.** Frequências de proporção de inativação obtidas em amostras controle, caso 1 e caso 2. A) Frequências de proporção quando considerados três limiares de desvio ( $\geq 70:30$ ,  $\geq 80:20$  e  $\geq 90:10$ ). B) Frequências de proporção quando se considera o limiar de 80:20.....38

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela I.1.** Número de mulheres observadas de acordo com proporção de inativação do cromossomo X (%) na amostra caso (mulheres com filho afetado por deficiência intelectual ligada ao X - presente estudo) e controle (Amos-Landgraf et al, 2006) de maneira aleatória e com desvio de inativação  $\geq 80:20$ , assim como análise estatística da comparação caso-controle ( $\chi^2$  e odds ratio).....21

**Tabela I.2.** CNVs classificadas como VOUS e provavelmente patogênicas em filhos afetados por deficiência intelectual, cujas mães apresentaram desvio de inativação  $\geq 70:30$ . Algumas mães também foram analisadas, como a amostra XB1M.....23

### Capítulo II

**Tabela II.1.** Teste de associação por  $\chi^2$  e odds ratio (OR) entre as amostras com limiares aleatório ( $<80:20$ ), e com desvio  $\geq 80:20$  observadas em amostra controle, histórico familiar de câncer (Caso 1) e diagnóstico de câncer de mama (Caso 2).....38

**Tabela II.2.** Teste de associação por  $\chi^2$  e odds ratio (OR) entre as amostras caso 1 e controle a partir da estratificação de idade em anos (limiar de 50 anos).....40

**Tabela II.3.** Segmentação da amostra caso 1 da faixa etária de  $\leq 50$  anos em dois tipos de câncer e testes de associação por exato de Fisher e odds ratio (OR).....41

### Apêndices

**Tabela 1.** Proporção de inativação do cromossomo X em 36 indivíduos do sexo feminino com ao menos um filho afetado por deficiência intelectual com sugestivo padrão de herança ligado ao X selecionadas no Hospital Universitário de Brasília, Distrito Federal.....58

**Tabela 2.** CNVs benignas e provavelmente benignas encontradas em mães e em pacientes do Hospital Universitário de Brasília com heredograma sugestivo de deficiência intelectual ligada ao X.....60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAIDD – Associação Americana de Deficiências Intelectuais e do Desenvolvimento (*American Association of Intellectual and Developmental Disabilities*)

CAM – Molécula de Adesão Celular (*Cell Adhesion Molecule*)

CLS – Solução de Lise Celular (*Cell Lysis Solution*)

CMA – Análise Cromossômica por Microarray (*Chromosomal Microarray Analysis*)

CNV – Variação do Número de Cópias (*Copy Number Variation*)

CNP – Polimorfismo do Número de Cópias (*Copy Number Polymorphism*)

CRASH – Hipoplasia do Corpo Caloso, Retardo, Polegares Reduzidos, Espasticidade e Hidrocefalia (*Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spasticity and Hydrocephalus*)

CTA - Antígenos Câncer-Testículo (*Cancer-Testis Antigens*)

DGV – Base de Dados de Variantes Genômicas (*Database of Genomic Variants*)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNPM - Desenvolvimento Neuropsicomotor

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EEG – Eletroencefalografia

lncRNA – RNA longo não codificante (*Long non-coding RNA*)

LTP – Potenciação de Longa Duração (*Long Term Potentiation*)

MLPA – Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)

NGS – Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing*)

OMIM – Herança Mendeliana em Humanos Online (*Online Mendelian Inheritance in Man*)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RBC – Célula Vermelha Sanguínea (*Red Blood Cell*)

RNA - Ácido Ribonucleico

RFU – Unidades de Fluorescência Relativa (*Relative Fluorescence Units*)

STR – Repetições Curtas em Tandem (*Short Tandem Repeats*)

TAD – Domínio Topologicamente Associado (*Topologically Associating Domain*)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEA - Transtornos do Espectro Autista

TE – Tampão de Eluição

VOUS – Variante de Significado Incerto (*Variant Of Uncertain Significance*)

XCE – Elemento Controlador do X (*X-Controlling Element*)

XIC – Centro de Inativação do X (*X Inactivation Center*)

XLID – Deficiência Intelectual Ligada ao X (*X-Linked Intellectual Disability*)

XLMR – Retardo Mental Ligado ao X (*X-Linked Mental Retardation*)

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
JUSTIFICATIVA .....	8
OBJETIVOS .....	9
CAPÍTULO I – Desvio de inativação do cromossomo X e CNVs associados à deficiência intelectual ligada ao X .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
2.1 Desenho de estudo e casuística .....	14
2.2 Análise do padrão de inativação do cromossomo X .....	15
2.2.1 Digestão do DNA .....	16
2.2.2 Amplificação do produto da digestão e eletroforese em gel de agarose.....	16
2.2.3 Eletroforese capilar.....	17
2.2.4 Razão de inativação.....	19
2.3 Análise estatística .....	19
2.4 Microarray .....	19
2.5 Demais exames moleculares.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
3.1. Análise de Inativação do Cromossomo X .....	20
3.2 Análise cromossômica por microarray.....	22
3.2.1 CNVs observadas e quadro clínico dos pacientes .....	23
3.3. Demais considerações .....	30
4. CONCLUSÕES .....	31
CAPÍTULO II - Inativação do cromossomo X e associação com portadoras de mutação para câncer.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.1 Amostra .....	36
2.1.1 Critérios de inclusão .....	36
2.2 Análise do padrão de inativação do cromossomo X .....	37

2.3 Análise estatística .....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4. CONCLUSÕES .....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
APÊNDICE I.....	58
APÊNDICE II.....	60
ANEXO I.....	64
ANEXO II.....	65

## INTRODUÇÃO GERAL

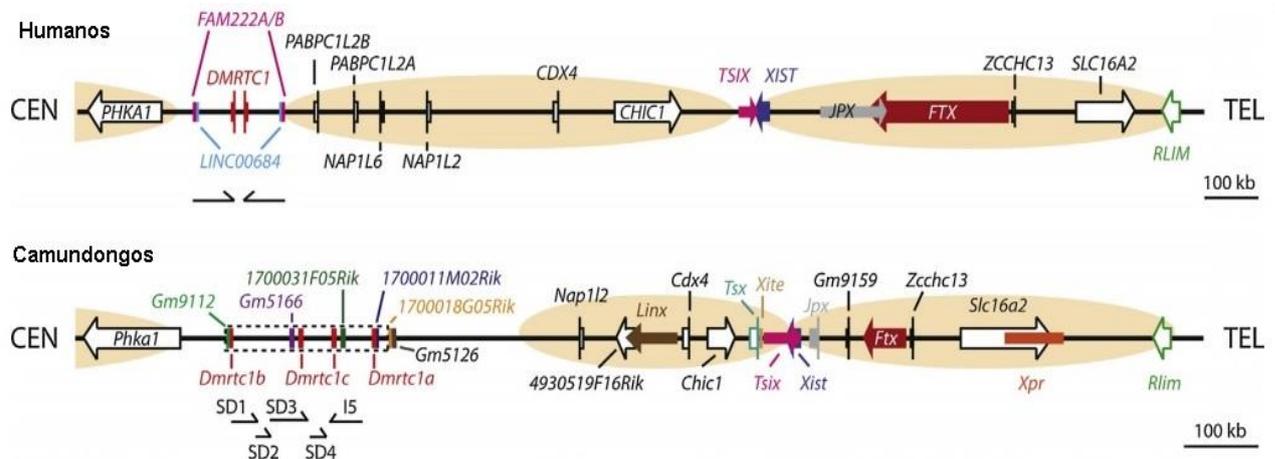
A evolução da determinação sexual por meio de cromossomos em mamíferos da subclasse Theria está ligada tanto à aquisição de um gene determinante, *SRY*, quanto a repressão da recombinação e isolamento reprodutivo (revisto por Graves, 2015). A presença de um cromossomo Y com o gene *SRY* funcional inicia o processo de diferenciação sexual masculino. Na ausência de alterações cromossômicas e gênicas, um mamífero tério com dois cromossomos X se desenvolverá em fêmea e um com um X e Y em macho. Em eutérios, o cromossomo X sofre ao menos duas formas de regulação. Na primeira, a compensação de dose é obtida em fêmeas pelo silenciamento de um dos cromossomos X (Lyon, 1961), e na segunda, o cromossomo ativo remanescente sofre *upregulation* para balanceamento de expressão com os cromossomos autossômicos (Ohno, 1967; Nguyen & Distèche, 2006; Moreira de Mello *et al.*, 2017).

Os processos moleculares envolvidos no silenciamento são regulados primordialmente pelo Centro de Inativação do X, o XIC (do inglês *X-inactivation center*) (Brown *et al.*, 1991a). Este locus contém os genes e componentes responsáveis pela contagem, iniciação e regulação da inativação do cromossomo X, sendo *Xist* o seu principal atuante e único gene necessário para iniciar todos os eventos epigenéticos de repressão de transcrição. Este gene produz um RNA longo não codificante (lncRNA) retido no núcleo revestindo em *cis* toda a cromatina do cromossomo a ser inativado (Brown *et al.*, 1991b).

A inativação do cromossomo X em camundongos está bem elucidada no momento e acontece em duas fases: após a fertilização, ainda no estágio da primeira clivagem, resultando em dois blastômeros, o genoma é reativado e a inativação imprintada do X paterno se inicia com a ativação de *Xist*. Em seguida, o X inativo é reativado na massa celular interna do blastocisto e inativado novamente de forma randômica no epiblasto (Okamoto *et al.*, 2004). O XIC de camundongos apresenta, paralelamente ao gene *Xist*, o gene *Tsix*, que produz outro RNA longo não codificante que reveste o gene *Xist* completamente, regulando-o negativamente no X ativo (Lee *et al.*, 1999). Também próximo ao XIC está o locus *Xce* (do inglês *X-controlling element*), regulador do mecanismo de escolha do cromossomo a ser inativado (Simmler *et al.*, 1993; revisto por Peeters *et al.*, 2016).

Já em humanos, a inativação é apenas randômica, envolvendo o silenciamento de cerca de 150 milhões de pares de base (Mb) (Boyd, 2001; Brown *et al.*, 1991b). Este processo também ocorre em *cis* por meio da expressão de *XIST* localizado no XIC, que está situado na

região Xq13.2. Em comparação a camundongos, o XIC humano sofreu expansão, porém apresenta menos reguladores, como ausência de *Xce* (figura 1). Cerca de 2000 moléculas de lncRNA *XIST* são produzidas (Buzin *et al.*, 1994), sofrem splicing e são poliadeniladas, direcionando a condensação da cromatina e revestindo o cromossomo (Clemson *et al.*, 1996). Entretanto, a presença de *TSIX* em humanos é considerada vestigial, tendo em vista que há uma deleção em uma de suas ilhas CpG e por isso a inativação não ocorre de forma imprintada. *TSIX* não cobre a região promotora de *XIST*, não sendo capaz de regular negativamente a sua expressão (Migeon *et al.*, 2001). Desta forma, um outro gene tem o papel de regulação do *XIST* em humanos.

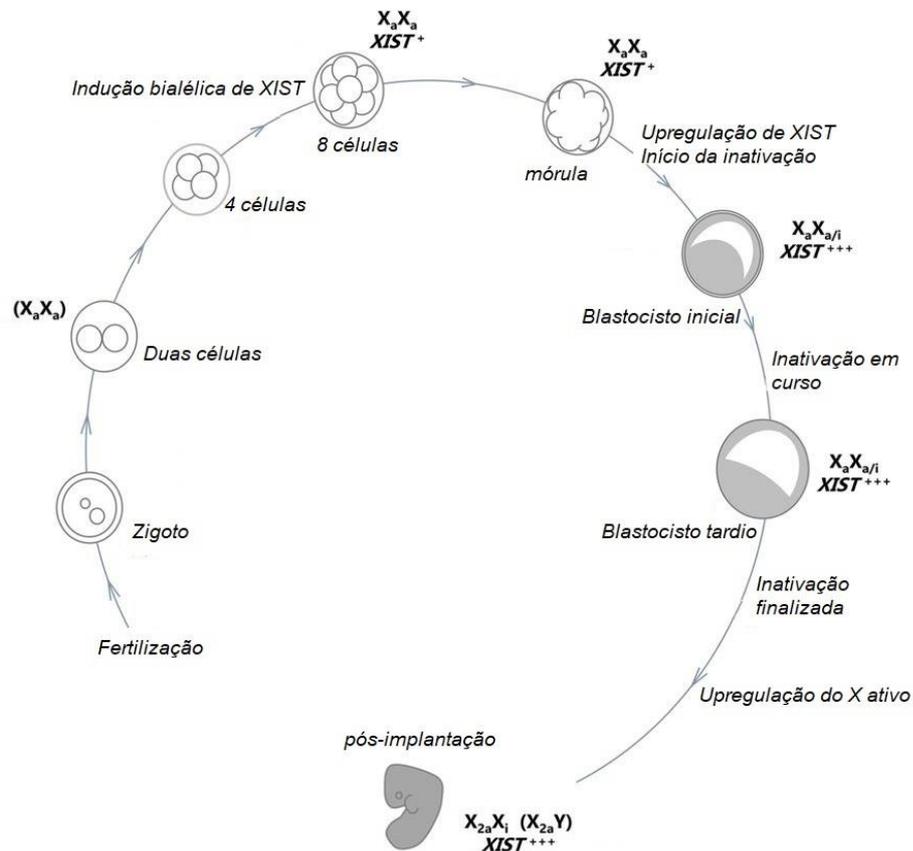


**Figura 1.** Ilustração comparando o XIC de humanos e camundongos, representados pelos domínios topologicamente associados (TADs - círculos ovalados laranjas), onde é possível observar que o locus humano apresenta menos componentes que o de camundongos, porém encontra-se expandido. O retângulo tracejado denota o locus *Xce* (*X-controlling element*) em camundongos, responsável pelo mecanismo de escolha do X a ser inativado. Setas abaixo de *Xce* indicam duplicações (SD) e inversões (I) que incluem o gene *Dmrtc1*. Genes codificadores de proteína estão ilustrados como setas brancas, indicando o sentido da transcrição. Genes de RNA não codificantes estão representados por setas coloridas (Adaptado de Peeters *et al.*, 2016).

Em embriões humanos pré-implantados, há a acumulação de *XIST* nos cromossomos X sem que haja a iniciação da inativação, diferindo de embriões de camundongos, onde a presença de *Xist* leva à inativação invariavelmente. O gene *XACT*, distante 40Mb de *XIST*, ausente em camundongos e pouco conservado em mamíferos, tem um papel específico em humanos, regulando esse estado de pré-inativação único (Vallot *et al.*, 2013). *XIST* e *XACT* revestem simultaneamente ambos os cromossomos ativos, porém *XIST* apresenta uma conformação dispersa, podendo explicar assim porque a inativação não é logo iniciada ao começo de sua expressão. Ao longo do desenvolvimento do blastocisto, os produtos de ambos

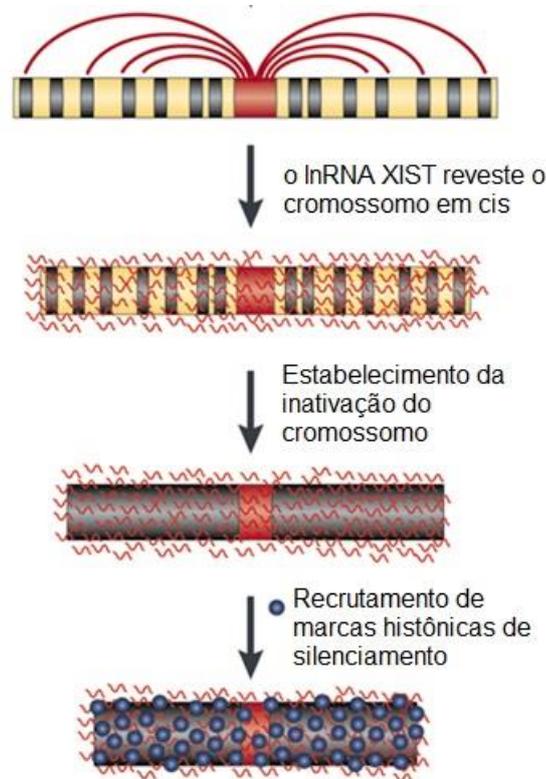
os genes ocupam domínios distintos dentro do núcleo e a expressão de *XACT* no cromossomo a permanecer ativo então influencia a acumulação de *XIST* em cis no cromossomo a ser inativado (Vallot *et al.*, 2017). Evolutivamente, assim, *XACT* controla o *timing* de inativação em humanos.

Ainda neste contexto, o embrião pré-inativado tem sido objeto de debate. Petropoulos *et al.* (2016) haviam proposto um modelo de compensação de dose dos dois cromossomos X ativos com cromossomos autossômicos no dia 7 do blastocisto, o que foi denominado de *X-dampening*, ou a diminuição da expressão de ambos os cromossomos. Entretanto, no ano seguinte foi demonstrado que o *X-dampening* é controverso (Moreira de Mello *et al.*, 2017), pois o decréscimo da expressão bialélica foi concomitante ao aumento de expressão monoalélica no dia 6 do blastocisto (figura 2), indicando o início da inativação neste estágio.



**Figura 2.** Modelo representativo das fases embrionárias associadas à inativação do cromossomo X em humano. A fase de duas células apresenta os dois cromossomos X ativos ( $X_aX_a$ ). Posteriormente, a expressão de *XIST* é induzida e iniciada no estágio de 8 células, sendo que mais a frente este gene sofre upregulação e a inativação é iniciada (blastocisto primário ( $X_aX_{a/i}$ )). A inativação já se apresenta finalizada na implantação e o X ativo sofre upregulação para compensação de dose com cromossomos autossômicos ( $X_{2a}X_i$ ) (Adaptado de Moreira de Mello *et al.*, 2017).

Assim, a inativação é iniciada e finalizada nas células tronco do embrião pouco antes da fase de implantação. Isso resulta em modificações epigenéticas (figura 3), como perdas e ganhos de histonas e seus modificadores, servindo de marcador para o acoplamento de proteínas *polycomb* (Zhao *et al.*, 2008), que são proteínas de remodelação da cromatina associadas a silenciamento gênico. O estudo de modificações de histonas relacionadas à inativação leva em consideração principalmente a acetilação e metilação de caudas de histonas, assim como a presença de macroH2A, e como esses marcadores diferem entre os X ativo e inativo. O X inativo é enriquecido em macroH2A, hnRNPU e SMCHD1 que atuam como reguladores epigenéticos no silenciamento (revisto em Sado & Brockdorff, 2013).



**Figura 3.** O processo de inativação do X é iniciado com a expressão do gene *XIST*, cujo produto é um RNA não-codificante que reveste o cromossomo a ser silenciado. Tal revestimento também recruta marcas histônicas, garantindo o caráter estável da inativação (imagem adaptada de Avner & Heard, 2001).

Quanto ao papel de *XIST* no silenciamento, a expressão de *XIST* em sítios diferentes no genoma foi testada para estabelecer um modelo de inativação e recrutamento epigenético (Kelsey *et al.*, 2015). Como resultado, os recrutamentos de SMCHD1, macroH2A, H3K27me3

e H4K20me1 ocorrem de forma independente um dos outros, mas são dependentes do local da inserção do gene *XIST*, assim como a eficiência do silenciamento e sua extensão através do cromossomo. Essa extensão também está relacionada com a habilidade de recrutar novos marcadores epigenéticos, demonstrando que as sequências que cercam *XIST* no XIC também são fundamentais no processo de inativação. Já outro estudo em camundongos com deleções em *Xist* mostra desvio na proporção de inativação, no qual o X com mutações não é capaz de iniciar inativação e o X *wild type* é silenciado em todas as células. Assim, *XIST* é essencial para iniciar inativação (Marahrens *et al.*, 1997).

Entretanto, o silenciamento não ocorre em todos os genes do X inativo e determinadas características têm sido relacionadas aos genes que escapam a inativação. Esses genes expressam pelo menos 10% de produto gênico no X inativo quando comparado à expressão do X ativo (Carrel & Willard, 2005). Os genes sujeitos à inativação apresentam marcas epigenéticas diferenciadas quando comparadas às dos genes que escapam, sendo essas típicas de heterocromatina inativa, como H3K9me3, H4K20me3 e H3K27me3, e ausência de marcas de cromatina ativa, como H3K4me3. Esta última está presente nos genes que escapam, assim como H3K4me2, H3K9ac e H3K27ac, e há ausência das marcas citadas na heterocromatina inativa (revisto em Balaton & Brown, 2016).

O padrão de escape em humanos é de em média 15% dos genes de ambos os cromossomos X sendo expressos (Carrel & Willard, 2005). Enquanto alguns genes sofrem escape em todas as mulheres, como por exemplo os genes da região pseudoautosômica, outros genes escapam ou estão inativos em parte dessas mulheres. Essa variação de escape é encontrada em 10% dos genes no cromossomo X e pode explicar a heterogeneidade clínica, isto é, mulheres portadoras de mutação patogênica podem ou não manifestar o fenótipo. O padrão de escape também pode variar no mesmo indivíduo, sendo a idade um fator influenciador, assim como no desvio da proporção de inativação (Hatakeyama *et al.*, 2004; Tonon *et al.*, 1998). Essa variação também pode ser encontrada em tecidos diversos no mesmo indivíduo, demonstrando heterogeneidade de expressão entre os tecidos.

Outra influência no processo de silenciamento é o grau de metilação do DNA, que varia de forma intergênica e intragênica - regiões de promotor e região codificante. A maioria da metilação ocorre em citosinas de ilhas CpG no genoma. No X inativo, as ilhas de CpG em região promotora são hipermetiladas, o que não ocorre em genes que sofrem escape, que possuem padrões de metilação semelhantes ao X ativo (Wolf *et al.*, 1984). A metilação do

DNA é um importante fator na manutenção da inativação, sendo demonstrado através de tratamento com inibidores de metiltransferase que alguns genes podem sofrer reativação (Venolia *et al.*, 1982). É uma modificação epigenética que ocorre tardiamente no processo de inativação, sendo assim é considerado como o fator que mantém a estabilidade do silenciamento (Beard *et al.*, 1995). A metilação geralmente segue um padrão. O gene codificador para o receptor de andrógeno (*AR*), segue tal padrão de metilação, o qual está hipermetilado quando o X está inativo em mulheres (Allen *et al.*, 1992). Neste caso, a metilação não somente é um marcador de expressão, mas um sinalizador do *status* de inatividade de genes no X.

Devido à ausência de *imprinting* na inativação do cromossomo X em humanos, tal processo é randômico, e é esperada uma proporção de inativação de 50:50 para o X materno e X paterno em um grupo de células policlonais. Pequenas variações na proporção 50:50 são consideradas comuns e não são consideradas desvios. Alguns estudos consideram o limiar de  $\geq 70:30$  como desvio (Plenge *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004), enquanto outros apenas valores  $\geq 80:20$  (Ørstavik, 2006), pois esses valores são ditos raros, e geralmente estão relacionados a doenças ligadas ao cromossomo X (com etiologia ligada a mutações ou aberrações cromossômicas) (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Assim, há discussão quanto ao limiar exato de desvio a ser considerado, e muitos estudos adotam vários limiares para comparação (Minks *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura, há alguns mecanismos pelos quais os desvios de inativação podem ocorrer, dentre eles: 1) Desvios podem ser herdados, e é estimado que um terço da variabilidade fenotípica de desvios em população não afetada está associada com questões hereditárias, devido à relação de dominância de alelos participantes do processo de inativação (Vickers *et al.*, 2001; Kristiansen *et al.*, 2005a). Porém, há estudo que contradiz isso (Bolduc *et al.*, 2008); 2) Por meio do processo de seleção celular por um dos cromossomos parentais ativos se um deles apresentar vantagens no desenvolvimento e/ou proliferação celular (Migeon, 2006). Isto foi sugerido após a observação de que desvios estão associados com idade e que isto poderia ser decorrente de seleção durante o desenvolvimento de leucócitos, e este processo só poderia ser verificado após sucessivas seleções ao decorrer do tempo. Este mecanismo é sugerido como atuante nos desvios observados em portadoras de mutação que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso (Muers *et al.*, 2007). 3) Mutações em genes que regulam o processo de inativação, como aqueles localizado no XIC, levando assim a uma deficiência na capacidade de iniciar a expressão de *XIST* e/ou o recrutamento de marcas

silenciadoras no X mutado (Marahrens *et al.*, 1997). 4) Fatores estocásticos, que também poderiam contribuir para o aumento de frequência de desvio em mulheres acima de 50 anos, devido à influência da diminuição no número de células tronco hematopoiéticas, levando à maior probabilidade do mesmo X ser inativado em diferentes células (Busque *et al.*, 1996).

Os genes do cromossomo X possuem grande relevância clínica e na manifestação do fenótipo de doenças, sendo isto relacionado tanto a mutações diretamente nestes genes, ou devido ao silenciamento deste cromossomo, que pode alterar os padrões de expressão. Devido à densidade de genes no X, um grande número de doenças pode conter a sua etiologia neste cromossomo. A plataforma OMIM® (2018), um catálogo online que lista genes e fenótipos patogênicos com etiologia genética, apresenta mais de 1200 entradas para o cromossomo X, sendo que padrões de inativação podem tanto amenizar quanto intensificar a patogenicidade de um fenótipo associado a esse cromossomo.

O conhecimento dos mecanismos epigenéticos de inativação são fundamentais para explicar síndromes de origem genética, tendo em vista que doenças relacionadas ao X estão entre as doenças congênitas mais comuns, como a Síndrome do X frágil, Rett, Hemofilia A e Distrofia Muscular de Duchenne. Padrões anormais ou desvios de inativação do X têm sido relacionados com câncer e doenças cognitivas, indicando assim o papel fundamental do cromossomo X no desenvolvimento (revisto em Lee & Bartolomei, 2013; Pageau *et al.*, 2007; Pienta *et al.*, 1989).

Tendo em vista a vasta associação deste cromossomo com tantos distúrbios genéticos, este trabalho tem como hipótese que padrões de inativação têm papel em modulação fenotípica e que portadoras de mutações/aberrações cromossômicas estruturais apresentam desvios de inativação mais frequentemente do que uma população controle, propondo assim o papel dessa análise no processo diagnóstico e aconselhamento genético.

## JUSTIFICATIVA

Diversas doenças apresentam sua etiologia no cromossomo X ou têm seus fenótipos modulados por genes localizados neste cromossomo, como a deficiência intelectual ligada ao X e determinados tipos de câncer. Sendo que muitas doenças ainda não apresentam causa identificada, devido à sua heterogeneidade etiológica, a investigação de padrões que diferenciem os portadores de mutações de uma população controle auxilia na investigação etiológica e dos processos envolvidos na progressão de tais distúrbios genéticos.

A realização de exames moleculares mais complexos apresenta um alto custo, principalmente em países em desenvolvimento onde todo o equipamento é importado, portanto uma ferramenta mais acessível de triagem de pacientes pode contribuir com diagnósticos mais assertivos. A inativação do cromossomo X é uma técnica que poderia ser empregada como auxiliar durante o processo de diagnóstico ou aconselhamento genético, pois é mais acessível tanto em manipulação laboratorial quanto economicamente quando comparada a outros exames moleculares mais complexos, como o CMA. Assim, pode ser reproduzida em diversos laboratórios que tenham estrutura mínima e ser uma possibilidade exequível de *screening* mesmo em locais com recursos mais limitados.

Caso se confirme a hipótese de que uma população portadora de mutação possui maior frequência de desvios de proporção de inativação do cromossomo X, este evento poderia ser considerado um marcador molecular de alterações genéticas. Dessa forma, a identificação de desvios poderia indicar os pacientes que requerem exames moleculares específicos, como CMA, MLPA ou aqueles direcionados para alterações no cromossomo X, como um painel de exoma.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se a ocorrência de desvio no padrão de inativação do cromossomo X em amostra de sangue periférico de portadoras de mutação pode ser utilizada como um marcador molecular no processo diagnóstico e aconselhamento genético de pacientes considerando dois casos: i. mães de meninos com deficiência intelectual (potenciais portadoras de mutação para deficiência intelectual ligada ao X) e ii. histórico familiar e/ou paciente afetada por câncer. Desta forma, este trabalho fará a abordagem deste objetivo geral por meio de dois capítulos, cujos objetivos específicos são:

### **Objetivos Específicos - Capítulo I**

- I. Estimar a frequência de desvio de proporção de inativação do cromossomo X em mulheres com ao menos um filho (sexo masculino) afetado por deficiência intelectual.
- II. Comparar a frequência de desvio de inativação do cromossomo X com mulheres de população controle.
- III. Buscar microarranjos (microdeleções e microduplicações) nos pacientes cujas mães apresentam desvio de inativação do cromossomo X.

### **Objetivos Específicos - Capítulo II**

- I. Estimar a frequência de desvio de proporção de inativação do cromossomo X em mulheres com histórico familiar de câncer e em mulheres com câncer.
- II. Comparar as frequências com população controle

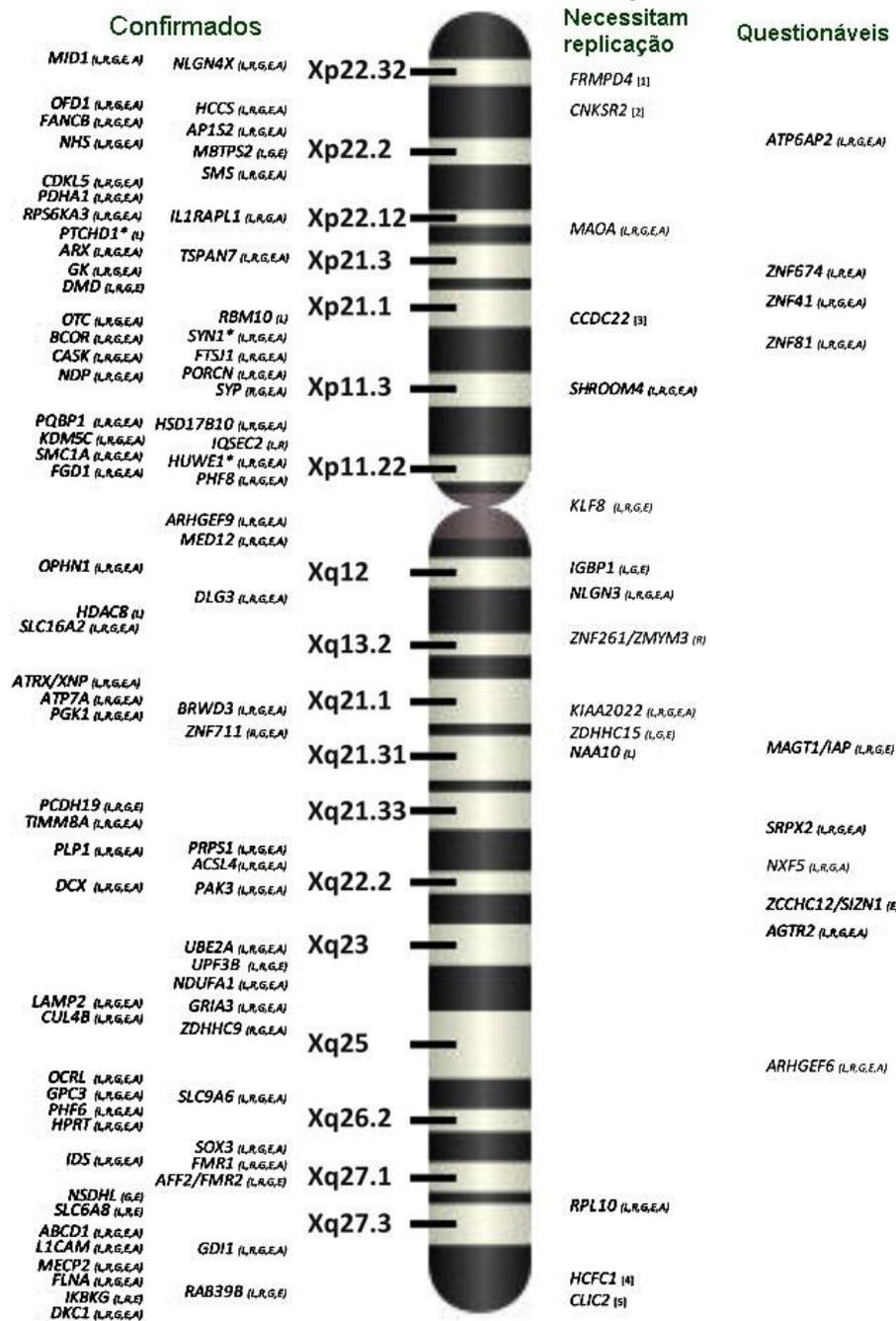
**Capítulo I - Desvio de inativação do cromossomo X e CNVs associados à deficiência intelectual ligada ao X**

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI) é o transtorno do desenvolvimento mais comum, afetando de 1 a 3% da população mundial (Harris, 2006; Maulik *et al.*, 2011) e tem como definição o quociente de inteligência abaixo de 70, limitações em duas ou mais habilidades adaptativas e o estabelecimento destes antes dos 18 anos de idade (American Association of Intellectual and Developmental Disabilities, 2018). A DI frequentemente ocorre associada a outros transtornos neurológicos, como Transtornos do Espectro Autista (TEA), ou como parte do fenótipo de alguma síndrome. Assim, a sua etiologia é heterogênea, tendo como causa fatores ambientais e/ou genéticos envolvidos.

Os genes associados à deficiência intelectual ligada ao X, denominada XLID (*X-linked intellectual disability*) e anteriormente XLMR (*X-linked mental retardation*), foram identificados antes daqueles situados nos autossômicos. Isso foi consequência do padrão de herança e da sua alta prevalência - estima-se que 10 a 15% dos casos de DI em homens apresentam mutações no cromossomo X. Uma das primeiras mutações identificadas foi a expansão de trinucleotídeos no gene *FMRI*, sendo esta causadora da XLID mais comum, a Síndrome do X Frágil (MIM 300624), contabilizando 2% dos casos de DI. Assim, a triagem para essa síndrome deve ser sempre conduzida quando investigando a etiologia das XLIDs, sendo essa uma tecnologia de baixo custo e de alta taxa diagnóstica.

Entretanto, há pelo menos 200 formas de XLID, sendo cerca de 150 destas na forma síndrômica, e mutações em mais de 100 genes estão relacionadas a 81 dessas síndromes (Lubs *et al.*, 2012). Nem todos os genes já descritos foram validados, pois certas mutações foram reportadas em poucos pacientes ou em famílias específicas e necessitam replicações para serem confirmados (figura I.1). Ainda, um grande número de síndromes associadas ao cromossomo X necessita ter sua etiologia investigada. A identificação de genes relacionados a essas síndromes é uma grande ferramenta na elucidação do papel do cromossomo X no sistema nervoso e dos mecanismos neurobiológicos associados. Ao menos 12% dos genes codificadores do cromossomo X já foram descritos como associados à função neurológica, sendo que a média para esse tipo de gene em outros cromossomos autossômicos é de 4% (revisto em Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Dessa forma, observa-se que o cromossomo X é enriquecido em genes com função neurológica, e a expressão deste cromossomo no cérebro é maior do que aquela notada em outros tecidos somáticos (Zechner *et al.*, 2001).



**Figura I.1.** Representação de 106 genes do cromossomo X associados com XLID, os quais tiveram as suas patogenicidades classificadas de acordo com o tipo e número de mutações reportados no OMIM em “confirmados, necessitam replicação e questionáveis”. Os classificados em “necessitam replicação” possuem poucas mutações reportadas em poucos pacientes ou em famílias específicas e necessitam replicações para serem confirmados. Aqueles classificados em “questionáveis” são genes cujas mutações apresentam relatos contraditórios na literatura, e portanto têm o seu papel monogênico na manifestação desses fenótipos como questionável (Adaptado de Piton *et al.*, 2013).

Desvios de proporção de inativação do X podem refletir mutações, visto que esses desvios podem ser resultado de forte seleção para o silenciamento de um cromossomo portador de mutação (Minks *et al.*, 2008). É observado também que desvio de proporção de inativação do X é uma característica relativamente comum em mulheres portadoras de mutação para XLID (Plenge *et al.*, 2002) e rara na população não afetada (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Um estudo com o gene *Atrx*, um importante regulador na remodelação da cromatina, demonstrou que em embriões de camundongos fêmea heterozigotas para deleção deste gene a inativação ocorre aleatoriamente, já que a mutação não afeta os mecanismos de inativação em si. Porém, ao decorrer do desenvolvimento do embrião ocorre seleção das células com o X *wild type* ativo de uma maneira tecido-dependente, o que justifica a observação de desvios ao fim do desenvolvimento (Muers *et al.*, 2007). Estes achados esclarecem um dos mecanismos pelos quais os desvios podem ser obtidos em portadoras de mutação para XLID.

A investigação de alterações genéticas pode ser efetuada utilizando os mais diversos testes existentes no mercado biotecnológico atual. Entretanto, a técnica de CMA (*Chromosomal Microarray Analysis*) é a única em consenso indicada como teste primordial para pacientes com DI em ambas as formas sindrômicas e não sindrômicas, devido à sua alta taxa diagnóstica - 15%-20% (Miller *et al.*, 2010). A técnica de CMA permite analisar microdeleções e microduplicações simultaneamente em milhares de sequências alvo do genoma que não seriam visíveis em cariótipo devido à sua baixa resolução. Estas variações no número de cópias (CNVs – *Copy Number Variation*), que são sequências de DNA de ao menos 1kb de extensão, possuem grande contribuição para variabilidade genômica polimórfica: as CNPs (*Copy Number Polymorphism*), com frequência de mais de 1% na população não afetada, podem contribuir para até 9,5% para a variabilidade do genoma (Zarrei *et al.*, 2015). Por outro lado, determinadas CNVs podem ser a etiologia de fenótipos patogênicos, cujos mecanismos podemos citar: a presença de genes dose-dependente, *breakpoints* que interrompem sequência codificante e localização em regiões regulatórias. Portanto, CNVs podem influenciar diretamente no fenótipo, ocasionando patologias, ou podem indicar suscetibilidade a doenças.

Investigar padrões que distingam os portadores de mutações no cromossomo X daqueles que não apresentam pode auxiliar na elucidação etiológica e dos processos envolvidos na progressão de tais distúrbios genéticos. Desta forma, este capítulo tem como hipótese que mulheres que possuem filhos afetados por deficiência intelectual ligada ao cromossomo X apresentam desvio de proporção de inativação do cromossomo X mais frequentemente de uma

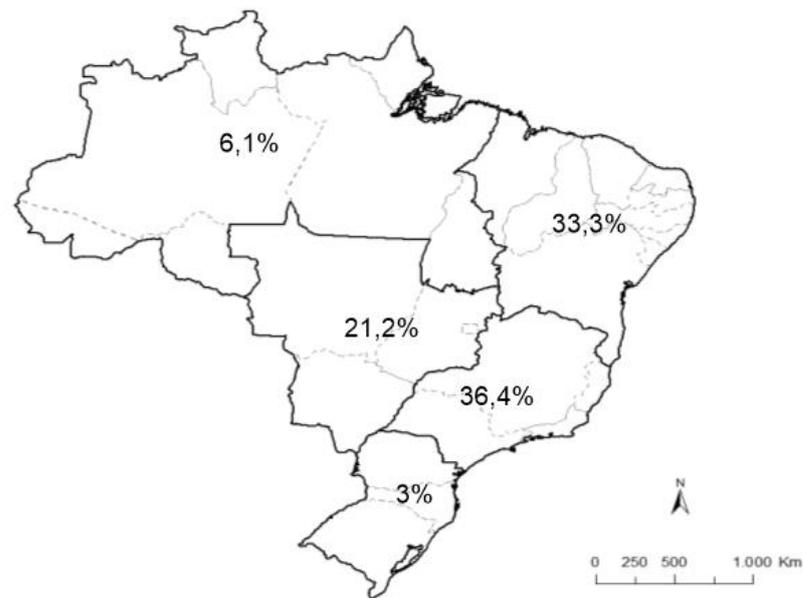
população controle e que este sinalize a ocorrência de alterações genéticas. Assim, a avaliação da inativação do cromossomo X poderia servir como ferramenta na proposta diagnóstica de pacientes afetados e no aconselhamento genético.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Desenho de estudo e casuística**

Dentre os casos de deficiência intelectual do Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília (Distrito Federal, Brasil), foram indicadas pelos geneticistas 36 famílias – pares de mães biológicas não afetadas e filho paciente afetado por deficiência intelectual com padrão sugestivo de herança ligada ao X. Todas as participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (CEP-FM 081/2009). Para inclusão na amostra, além do padrão de herança sugestivo de XLID, o paciente deveria ter cariótipo convencional normal e ausência de alteração genética característica de síndrome do X frágil. O tecido utilizado foi sangue periférico, cujo DNA foi extraído utilizando o protocolo Puregene (Qiagen) adaptado (Anexo I).

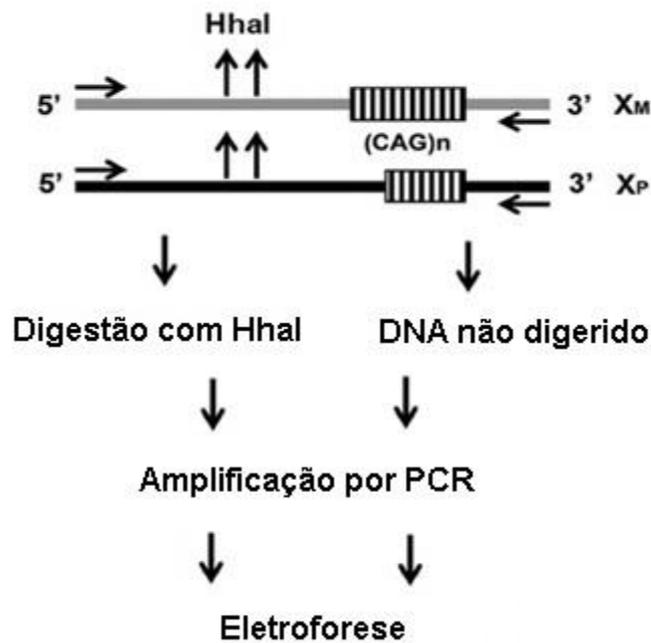
A análise de inativação do cromossomo X foi realizada para as mães biológicas. A média de idade das mulheres participantes foi de  $38,3 \pm 6,3$  anos, com valor de mediana e moda de 38. Considerando as informações sobre a naturalidade de 33 indivíduos da amostra, observou-se que, 21,2% eram provenientes do Centro-Oeste, 36,4% do Sudeste, 33,3% do Nordeste, 6,1% do Norte e 3% do Sul do Brasil (figura I.2). Das declarantes de etnia (n=20), 45% se declararam como brancas, 15% negras e 40% pardas. Duas mulheres relataram casamento consanguíneo. Estes valores demonstram miscigenação e sugerem representatividade da população brasileira, tendo em vista que as proporções se assemelham às médias nacionais.



**Figura I.2.** Representatividade aproximada das regiões brasileiras na amostra de mulheres com filhos afetados por deficiência intelectual ligada ao X do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

## 2.2 Análise do padrão de inativação do cromossomo X

Para estimar a proporção de cromossomo X materno e paterno que foi inativado em cada mãe, foi analisado um marcador genético do tipo microssatélite localizado no gene *AR* (*Androgen Receptor*) cujo protocolo foi adaptado de Allen *et al.* (1994). A metilação no resíduo de desoxicitosina no dinucleotídeo CpG presente no sítio de corte das enzimas de restrição sensíveis à metilação HpaII e HhaI no primeiro éxon do gene *AR* está correlacionado com a inatividade do cromossomo X, já que tal enzimas apenas digerem o DNA quando o resíduo de desoxicitosina não está metilado (Allen *et al.*, 1992). Tal sítio de corte é localizado próximo a uma região de trinucleotídeos altamente polimórfica (cerca 20 alelos e 90% de heterozigose), sendo possível então distinguir os padrões de metilação nos alelos paternos e maternos após PCR. Assim, o ensaio utiliza a amplificação para análise do marcador genético antes e depois da digestão com a enzima (figura I.3). A etapa sem digestão permite determinar os alelos presentes na mulher e após a digestão mostra se há inativação preferencial de algum desses alelos e, conseqüentemente, de um dos cromossomos X. As reações que seguem foram adaptadas do estudo de Allen *et al.*, 1992.



**Figura I.3.** Fluxograma representativo do protocolo de análise de inativação do cromossomo X, ilustrando o sítio de corte da enzima HhaI próximo ao STR (CAG)<sub>n</sub> do gene *AR*. O material digerido e o não digerido são amplificados por PCR. Então, a eletroforese é conduzida tanto em gel de agarose, para confirmar a eficiência da digestão, como em capilar, para detecção de fragmento (imagem adaptada de Comertpay *et al.*, 2014).

### 2.2.1. Digestão do DNA

Foram preparadas duas reações simultaneamente:

- i. 1 µg de DNA com 20U da enzima HhaI (*New England Biolabs*) e demais reagentes de reação (água, tampão e BSA);
- ii. 1 µg de DNA sem enzima, apenas reagentes e tampão de reação da enzima.

Todas as reações tiveram 20 µl em volume e foram encubadas por 16h a 37°C.

### 2.2.2. Amplificação do produto da digestão e eletroforese em gel de agarose

Após a digestão, as amostras foram preparadas para que o marcador situado no gene *AR* seja amplificado por PCR. A sequência amplificada possui aproximadamente 280pb e inclui as regiões que cercam o sítio de corte da enzima HhaI e os trinucleotídeos polimórficos, e só ocorrerá se o sítio de restrição estiver metilado. Se não houver metilação, a enzima irá efetuar cortes entre os trinucleotídeos e a amplificação não será possível. Desta forma, um controle

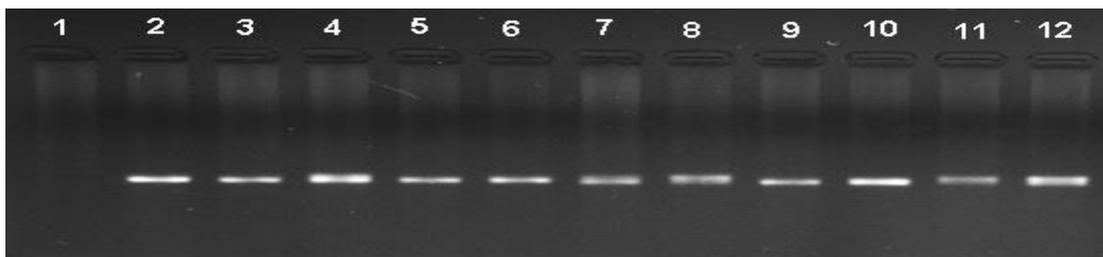
positivo com DNA de um indivíduo do sexo masculino foi utilizado para verificar a eficiência da digestão com a ausência de amplificação.

À reação de PCR são adicionados 4µl de produto da reação de digestão, Taq Polimerase 5U/ul, MgCl<sub>2</sub> 50mM, dNTP 2,5mM, DMSO 100%. Os primers (5µM) utilizados possuem as seguintes sequências (Tilley *et al.*, 1989):

1. 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3';

2. (fluoróforo 5' 6-FAM) 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'.

A amplificação foi efetuada utilizando o equipamento *Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cyclers* e essa foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5X (figura I.4) para detecção de bandas e avaliação da digestão, em corrente de 100V e 120A por 60 minutos.

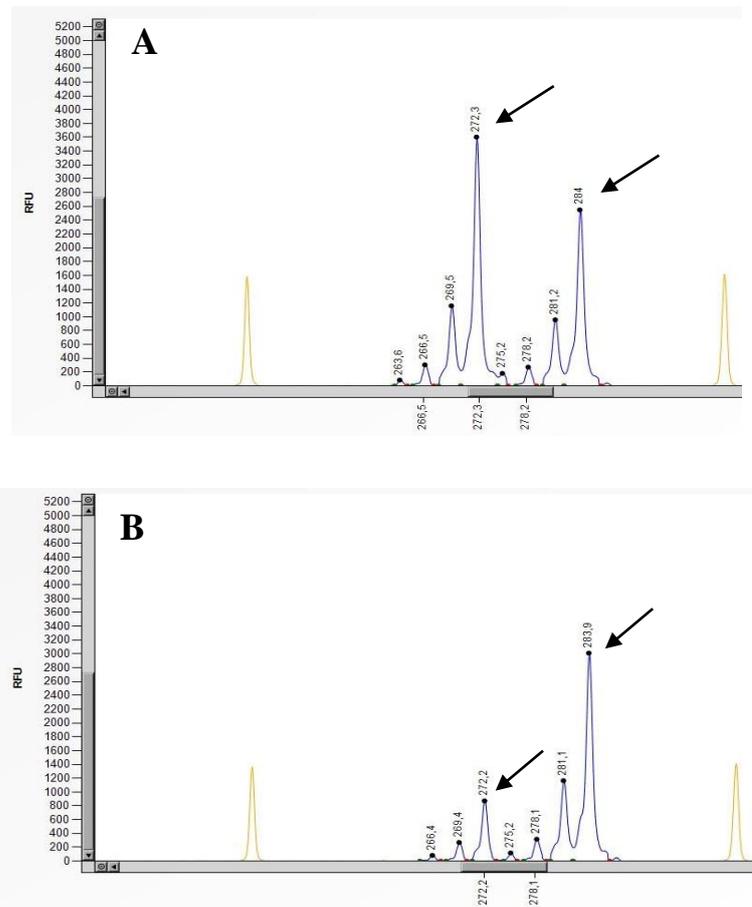


**Figura I.4.** Fotografia de gel de agarose de amostras de DNA digeridas e não digeridas em ensaio do gene *AR* para determinação de inativação do cromossomo X. O primeiro poço indica uma amostra de DNA digerida de um indivíduo do sexo masculino, onde nenhuma banda de amplificação foi verificada, o que garantiu a eficiência da digestão. O poço seguinte (2) indica a mesma amostra de DNA sem digestão, na qual é esperada e verificada a presença de banda de amplificação. Os demais poços (3 a 12) são correspondentes a amostras de DNA de mulheres digeridas e não digeridas, onde é esperada a visualização de banda mesmo após a digestão, devido a presença de um cromossomo inativo que sofre amplificação.

### 2.2.3. Eletroforese Capilar

O material amplificado foi genotipado por eletroforese capilar em sequenciador automático *ABI-3130xl - Life Technologies* em parceria com o Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia Molecular da Universidade Católica de Brasília - Campus Asa Norte. A preparação das amostras para esta técnica utilizou 1µl da diluição de 1µl do produto de PCR em 10µl de água *nuclease free*, 0,1µl de marcador de peso molecular GS500 LIZ (*Applied Biosystems*) e 9µL de Hi-Di Formamida.

Este tipo de eletroforese apresenta alta eficiência na separação de fragmentos, devido ao uso do capilar, que por razões geométricas e resistência elétrica permite que mesmo pequenas amostras de DNA sejam perceptíveis e analisáveis (Spudeit *et al.*, 2012). Os dados gerados pelo sequenciador foram analisados no software *Coffalyser.NET*<sup>TM</sup> (Coffa & Berg, van den, 2011), que permite a visualização dos fragmentos por eletroferograma. A Figura I.5 ilustra exemplos de eletroferogramas mostrando as duas etapas da análise. Nesse caso, trata-se de uma mulher com desvio de inativação do cromossomo X (83:17, cujo cálculo de razão será tratado a seguir), o que fica evidente pela diferença entre o primeiro e o segundo eletroferograma.



**Figura I.5.** Eletroferograma com picos de *Relative Fluorescence Units* (RFU) referentes aos fragmentos obtidos por eletroforese capilar antes e após digestão e amplificação do STR do gene *AR*. A) Eletroferograma referentes a amostra de DNA não digerida, com fragmentos correspondentes aos alelos (setas). B) Mesma amostra de DNA após digestão, onde um dos fragmentos sofreu maior redução de RFU, e consequentemente, o cromossomo correspondente estava ativo com maior frequência. A proporção de inativação nesta amostra é de 83:17. Imagens geradas utilizando o software *Coffalyser.NET*<sup>TM</sup>.

#### 2.2.4. Razão de Inativação

Cada alelo do gene *AR* apresenta um pico de fluorescência, sendo que a altura dos picos foi analisada antes e depois da digestão através da fórmula de razão de inativação a seguir (Bittel *et al.*, 2008):

$$\frac{\left(\frac{aD}{aND}\right)}{\left(\frac{aD}{aND}\right) + \left(\frac{AD}{AND}\right)}$$

Onde:

aD: Alelo menor digerido;

aND: Alelo menor não digerido

AD: Alelo maior digerido

AND: Alelo maior não digerido

Tal cálculo resulta na porcentagem de inativação dos alelos, sendo então possível determinar a proporção de inativação. Os limiares de desvio de proporção de inativação foram classificados de acordo com a literatura (Sato *et al.*, 2004; Plenge *et al.*, 2002).

### 2.3. Análise estatística

Os dados de frequência de desvio de proporção de inativação em mulheres com filho afetado por deficiência intelectual ligada ao X foram comparados com dados presentes em Amos-Landgraf *et al.* (2006), nos quais os valores brutos foram estimados utilizando as proporções publicadas. Para tanto, foram realizados os testes de  $\chi^2$  e Regressão Logística, cujo resultado é o valor de odds ratio, sendo o limiar utilizado o de  $\geq 80:20$ . Foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ .

### 2.4. Microarray

A Análise Cromossômica por Microarray (CMA) consiste em uma técnica de hibridização do DNA genômico com sondas que abrangem múltiplas regiões do genoma. Através da análise de intensidade de sinal gerada pode-se indicar microdeleções ou

microduplicações, comparando esses resultados encontrados com as variantes descritas em bancos de dados do genoma humano

Para esse trabalho, o CMA foi realizado em pacientes cujas mães apresentaram valores de desvio de inativação do cromossomo X acima de 70:30. Foi utilizada a plataforma *CytoScan™ 750k Array* da empresa *Thermo Fisher Scientific®*. A análise das alterações foi feita utilizando o software *Chromosome Analysis Suite (ChAS)* da mesma empresa juntamente com a plataforma *UCSC Genome Browser Gateway*, que tem disponível dados das plataformas *DGV* e *Decipher*, bases de dados que compilam variantes polimórficas e patogênicas respectivamente. O genoma de referência utilizado foi o *Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37/hg19)*. Essa análise também foi conduzida em determinadas mães de pacientes, proposta realizada para investigar a hereditariedade de alterações sugeridas de estarem associadas aos quadros clínicos dos pacientes.

## **2.5. Demais exames moleculares**

Determinados pacientes foram examinados sob outras análises moleculares, sendo essas o exame de MLPA (amplificação de sonda dependente da ligação multiplex) e exoma. Estas análises não constituíram o escopo deste trabalho, porém eram informações contidas em prontuário, e portando ofereceram dados complementares para o estudo do quadro clínico desses pacientes. O exame de MLPA consiste na amplificação simultânea de diversas regiões do genoma através de PCR para verificar possíveis deleções ou duplicações. Já a análise de exoma sequencia regiões codificantes do genoma em busca de identificar possíveis mutações patogênicas. Ambas as análises podem ser customizadas para investigar determinados genes e direcioná-las de forma mais eficiente a buscar variantes envolvidas em patologias.

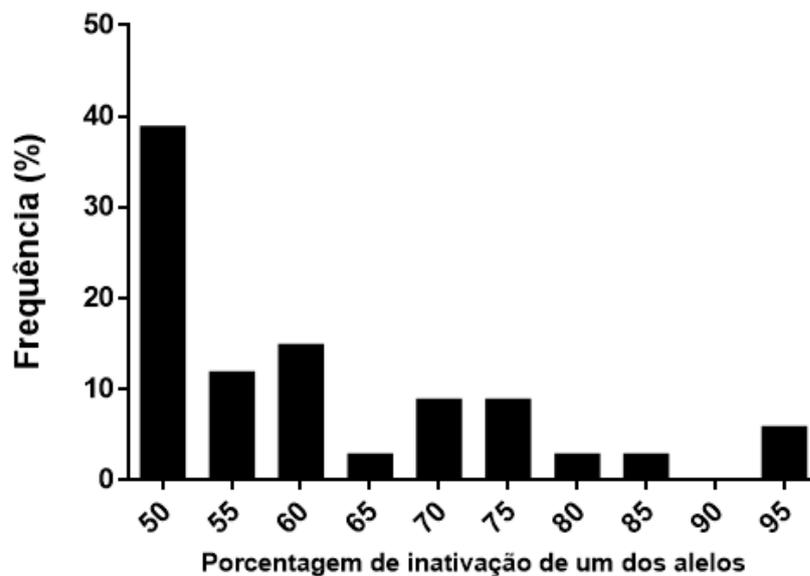
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Análise de Inativação do Cromossomo X**

A análise conduzida em 36 mulheres mostrou que 8,3% (n=3) da amostra era homozigota para o marcador no gene *AR*, levando à impossibilidade do estabelecimento do padrão de inativação para estas mulheres. Das amostras possíveis de estabelecer o padrão (n=33), 30,3% (n=10) das mulheres apresentaram-se acima dos valores de 70:30, sendo que 9,1% ao limiar de 80:20 e 6,1% ao limiar de 90:10 (figura I.6 e tabela I.1). A média observada de inativação de

um dos alelos foi de 64,2% ( $\pm 13,7$ ) e mediana de 60%. A tabela completa com resultados referentes aos padrões de inativação encontra-se no Apêndice I.

Em comparação com a literatura disponível, observou-se dado similar quanto a frequência de homozigose ( $\sim 8\%$ ) (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Entretanto, não se observou diferença estatística entre os dois grupos para a ocorrência de desvio ( $p > 0,05$ ), como observado pelo  $\chi^2$  e odds ratio (tabela I.1).



**Figura I.6.** Distribuição da frequência de mulheres ( $n=33$ ) com filho afetado por deficiência intelectual com heredograma sugestivo de herança ligada ao X de acordo com seus relativos padrões de inativação divididos em *bins* de 5%.

**Tabela I.1.** Número de mulheres observadas de acordo com proporção de inativação do cromossomo X (%) na amostra caso (mulheres com filho afetado por deficiência intelectual ligada ao X - presente estudo) e controle (Amos-Landgraf *et al.*, 2006) de maneira aleatória e com desvio de inativação  $\geq 80:20$ , assim como análise estatística da comparação caso-controle ( $\chi^2$  e odds ratio).

Proporção de inativação	Controle	Caso	<i>p</i>
Aleatório	917	28	
80:20	88	5	
n	1005	33	
$\chi^2$	1,6021		0,2056
OR (95% CI)	1,8608 (0,7009 a 4,9402)		0,2126

A presença de desvio de inativação em mulheres não afetadas fenotipicamente é considerada um evento raro e que tem um aumento de frequência com a idade, sendo que em neonatos é um evento mais incomum ainda (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). O estudo de Plenge *et al.* (2002) mostrou que uma amostra de mulheres portadoras de mutação para XLID teria uma frequência de desvio  $\geq 80:20$  aumentada, contabilizando 50% da amostra. Porém, este estudo avaliou 94 mulheres pertencentes a 24 famílias, tornando o viés da amostra consideravelmente elevado tendo em vista o número elevado de mulheres portadoras das mesmas mutações, sendo assim uma amostra redundante.

A amostra aqui analisada foi composta por mulheres não aparentadas que potencialmente apresentam diferentes CNVs e alelos. Dessa forma, com o número amostral de 36 mulheres, observamos frequências similares ao controle descrito em literatura, que considera amostras aleatórias não afetadas representativa de vários segmentos, desde de neonatos até mulheres adultas (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). A amostra avaliada por Brandão (2015), na mesma cidade de Brasília, mostrou frequências de desvios mais elevadas em comparação a de Amos-Landgraf *et al.* (2006). A diferença observada pode ser justificada pela idade média mais elevada das mulheres da amostra de Brandão (2015), demonstrando que a análise de desvio de inativação deve ser efetuada com cautela quando realizado em mulher acima de 50 anos.

### **3.2. Análise cromossômica por microarray**

A CMA foi conduzida em sete pacientes cujas mães apresentaram desvio acima do limiar de 70:30. Foi encontrado um total de 46 CNVs, sendo que 37 foram classificadas como “provavelmente benigna” e duas como “benigna”. Quatro CNVs foram consideradas “variante de significado incerto” (do inglês *Variant Of Uncertain Significance* - VOUS) e três “provavelmente patogênica” (tabela I.2). Foram verificadas grandes perdas de heterozigose no cromossomo X, sendo estas classificadas como provavelmente benignas. Perdas de heterozigose quando localizadas em regiões pericentroméricas deste cromossomo são consideradas relativamente comuns devido à baixa taxa de recombinação desta região na meiose II em mulheres. Desta forma, mesmo com o tamanho considerável de algumas destas variantes (>10Mb), não há efeito fenotípico associado. Todas as CNVs provavelmente benignas e benignas encontradas estão apresentadas no Apêndice II.

**Tabela I.2.** CNVs classificadas como VOUS e provavelmente patogênicas em filhos afetados por deficiência intelectual, cujas mães apresentaram desvio de inativação  $\geq 70:30$ . Algumas mães também foram analisadas, como a amostra XB1M.

Interpretação	Tamanho (kbp)	Tipo	Região	Genes	Amostra
Provavelmente Patogênica	411	Deleção	16p12.2	<i>NPIP3, LOC100190986, SMG1P3, MIR3680-2, MIR3680-1, SLC7A5P2, LOC101927814, METTL9, IGSF6, OTOA, RRN3P1</i>	XB7F
Provavelmente Patogênica	75	Duplicação	Xq28	<i>PNCK, SLC6A8, BCAP31, ABCD1</i>	XB7F
Provavelmente Patogênica	23	Deleção	1q22	<i>GBAP1, GBA</i>	XB5F
VOUS	2,018	Deleção	10q11.22	<i>AGAP4, PTPN20, FRMPD2B, BMS1P5, FAM35BP, LOC102724593, SYT15, GPRIN2, NPY4R, CH17-360D5.1, LINC00842, HNRNPA1P33, ANXA8, FAM25C, FAM25G, AGAP9, BMS1P6, FAM35DP, ANTXRLP1, ANTXRL, FAM25BP, ANXA8L1, CTSLP2</i>	XB6F e XB10F
VOUS	89	Deleção	5q35.3	<i>BTNL8, BTNL3</i>	XB6F
VOUS	86	Deleção	1q21.1	<i>NBPF20, NBPF9, PDE4DIP</i>	XB7F
VOUS	32	Deleção	Xp11.23	-	XB1M

### 3.2.1 CNVs observadas e quadro clínico dos pacientes

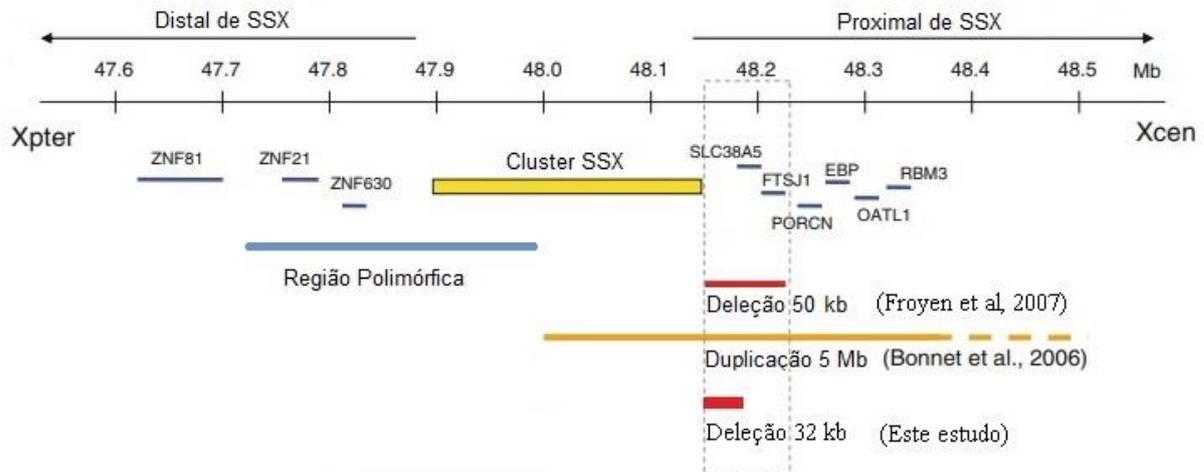
Abaixo estão apresentadas e discutidas as CNVs do tipo VOUS e provavelmente patogênicas observadas nos sete pacientes, cujas mães apresentaram valores  $\geq 70:30$ . Considerou-se aqui o potencial envolvimento dessas CNVs na etiologia de XLID e nos desvios observados.

#### *Família XB1*

A mãe XB1M (31 anos) apresentou desvio total em sua proporção de inativação do cromossomo X (100:0). O filho XB1F apresenta um quadro sindrômico sugestivo de XLID, cujo fenótipo inclui: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), incluindo a fala, criptorquidia bilateral, dismorfias faciais, macrocefalia e convulsões. Há relatos na família materna de anencefalia e convulsões. A CMA não revelou alterações provavelmente

patogênicas para esse paciente, entretanto foi verificada a presença de uma deleção de 32 kpb na região Xp11.23 na mãe do paciente, sendo esta considerada VOUS. Mesmo que esta variante seja de tamanho reduzido e não inclua genes, há relato na literatura de desvio associado à esta região (Froyen *et al.*, 2007).

Froyen *et al.* (2007) descreveram uma família com três irmãos afetados com deleção sobrepondo esta região e Bonnet *et al.* (2006) descreveram uma duplicação nesta região em paciente afetado por deficiência intelectual, baixa estatura e autismo. A região descrita por Froyen *et al.* (2007) inclui a deleção de dois genes, *SLC38A5* e *FTSJI*, sendo o primeiro descrito como não patogênico e o último como patogênico. A mãe dos pacientes apresenta desvio total de inativação (100:0). Mesmo que a haploinsuficiência de *FTSJI* explique o quadro clínico dos três irmãos, é interessante notar a posição distal do *breakpoint* da deleção, que coincide com a de XB1M (figura I.7). Na região do *breakpoint* distal observa-se cluster de genes da família *SSX*. Foi proposto que a região flanqueadora a esse cluster é instável e propensa a formar estrutura secundária cruciforme devido à sua sequência palindrômica, e assim ser um *hotspot* para recombinações, podendo ocorrer de forma balanceada ou causando deleções ou duplicações nesta região. A porção distal do cluster apresenta sequências polimórficas, entretanto a porção proximal está envolvida em fenótipos clínicos. Translocações t(X;18)(p11.2;q11.2) envolvendo essa região causando fusão gênica são características de sarcomas sinovais (Ladanyi, 2001), uma forma de câncer altamente invasivo, demonstrando o potencial patogênico desta região e o seu envolvimento com a suscetibilidade ao câncer.



**Figura I.7.** Representação da região Xp11.23. Em amarelo o cluster gênico da família *SSX* e genes que o circundam. Na sua porção distal, a região com polimorfismos descritos. Na região proximal, as variantes patogênicas descritas na literatura e a encontrada em XB1. As posições em Mb são referentes ao genoma hg18 (imagem adaptada de Froyen et al, 2007).

Ademais, outros pacientes no *Decipher* que apresentam CNVs sobrepostas a esta também apresentam macrocefalia, dismorfias faciais, convulsões e atraso no DNPM. Pelo fato de a deleção de XB1M ser em uma região intergênica, há a possibilidade da presença de *enhancers* e promotores para os genes *SLC38A5* e *FTSJ1*, ambos envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso. O fenótipo associado às mutações em *FTSJ1*, que codifica uma proteína metiltransferase de RNA transportador e está associada a estabilidade ribossomal, é a deficiência intelectual, sendo que dismorfias e convulsões teriam que ser explicadas por alterações em outras regiões, como a do gene *SLC38A5*, que codifica uma proteína transportadora de creatinina. Entretanto, o filho paciente não herdou esta mutação, não explicando assim o seu quadro clínico. Mas pelo fato da mãe ser portadora, isto pode estar associado ao desvio total observado, pois possivelmente a sinergia da alteração de expressão em ambos os genes teria um efeito no desenvolvimento celular, ocasionando em seleção. Porém tais conclusões não poderiam ser traçadas como definitivas devido à natureza intergênica da deleção, sendo esta considerada VOUS.

### ***Família XB3***

A mãe XB3M (33 anos) apresentou desvio de 86:14, tendo o seu filho XB3F herdado o cromossomo preferencialmente inativado. O paciente apresentou XLID não sindrômica com distúrbios de comportamento, como agressividade e inquietação, sendo que o exame de EEG demonstrou uma disfunção córtico-subcortical temporal esquerdo. A CMA não apresentou

variantes patogênicas. O MLPA, realizado após o presente estudo, verificou uma microdeleção no gene *GDI1*, localizado na região Xq28.

Este gene é um inibidor de desassociação de proteínas Rab, regulando as reações de troca dos ligantes GDP-GTP. As proteínas Rab estão envolvidas no reconhecimento, ancoramento e fusão de membranas no tráfego vesicular. Quando ligadas à proteína *GDI1*, têm a sua propriedade hidrofílica aumentada, ficando livres no citosol e permanecendo na conformação inativa associadas ao GDP, estando assim disponíveis para intermediar outros processos. Já nas Rabs que estão associadas à membrana, *GDI1* atua facilitando a desassociação do GDP, o liberando assim para se associar posteriormente a outras Rabs (Bächner *et al.*, 1995). A expressão deste gene se dá principalmente em tecidos do sistema nervoso e é expresso em todas as partes do cérebro adulto humano (D'Adamo *et al.*, 1998). *GDI1* é altamente conservado em eucariotos, porém com significativa taxa de evolução em primatas, demonstrando assim o seu papel essencial no desenvolvimento do sistema nervoso nesta Ordem e o seu possível papel evolutivo no aumento em tamanho e complexidade cerebral (Dorus *et al.*, 2004).

Mutações neste gene estão associadas à XLID não síndrômica, sendo a deficiência intelectual o único fenótipo a ser observado. Entretanto, algumas variações fenotípicas estão presentes em diferentes pacientes, como os distúrbios comportamentais observados neste. Assim, a mutação encontrada justifica o quadro clínico de XB3F e é responsável por 0.5-1% dos casos de XLID não síndrômica (Bienvenu *et al.*, 1998).

### ***Família XB5***

A amostra XB5M (48 anos) apresentou a proporção de inativação de 80:20 e seu filho herdou o cromossomo preferencialmente inativado. O paciente XB5F apresenta convulsões desde 1 ano e 6 meses. Possui irmão apenas por parte de mãe diagnosticado com autismo aos 16 e posteriormente com esquizofrenia. Teve desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) normal, porém com dificuldades de aprendizagem e comportamento agressivo. A CMA não apresentou alterações patogênicas que explicassem o quadro clínico do paciente. Foi observada uma CNV de deleção na banda 1q22, sendo considerada possivelmente patogênica por deletar parcialmente o gene *GBA*. Este gene codifica a enzima lisossômica beta-glicocerebrosidase, responsável pela quebra do glicolípido glicosilceramida em ceramida e glicose (Beutler, 1992). Quando em homozigose esta deleção ocasiona a Doença de Gaucher (revisto por Jmoudiak & Futerman, 2005) Esta deleção também está relacionada à predisposição a

Demência com Corpos de Lewy e Mal de Parkinson (Goker-Alpan *et al.*, 2004, 2006), ambas doenças neurodegenerativas de manifestação tardia, demonstrando mais uma vez o potencial patogênico desta variante, porém sem afetar o *fitness* de seu portador heterozigoto em idade reprodutiva.

### ***Famílias XB6 & XB10***

A amostra XB6M (39 anos) apresentou um padrão de inativação de 78:22. O filho paciente XB6F apresenta deficiência intelectual, agitação e agressividade. A CMA não encontrou alterações que explicassem o quadro clínico do paciente. Entretanto, foram encontradas duas VOUS, sendo uma deleção em 5q35.3, que apresenta genes da família Butirofilina-like (*BTNL*). Estes genes são preferencialmente expressos no cólon, duodeno e intestino delgado e controlam a resposta de linfócitos T, sendo associados a doenças inflamatórias e predisposição a câncer nestes tecidos (Lebrero-Fernández *et al.*, 2016).

A segunda VOUS encontrada foi uma deleção de 2Mb em 10q11.22, sendo também observada na CMA de XB10F. A mãe XB10M (38 anos) deste segundo paciente apresentou desvio de 72:28 e o filho herdou o cromossomo preferencialmente inativado na mãe. O quadro clínico observado inclui, além de DI, atraso na fala, insônia, agressividade na adolescência, alta estatura, assimetria corpórea e manchas hipercrômicas no dimídio esquerdo. Apresenta relato de irmão afetado e suicídio na família.

Esta VOUS encontrada em ambos os pacientes abrange uma região de 20 genes, entretanto a literatura não é consensual quanto à patogenicidade de alguns deles. O gene *GPRIN2*, notavelmente atua como indutor de crescimento de processos neuronais e a sua expressão tecidual é dita como pronunciada no cerebelo (Artuso *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 1999; Soueid *et al.*, 2016), porém a plataforma do NCBI apresenta que a expressão é favorecida no pulmão, pele e sistema digestório considerando o trabalho de Fagerberg *et al.* (2014). Sudmant *et al.* (2010) verificaram expansões específicas em genes que atuam no desenvolvimento do sistema nervoso em humanos, incluindo *GPRIN2*, constatando que esse gene apresenta duplicações polimórficas. Em contrapartida, Chen *et al.* (2016) verificaram associação de duplicações deste gene com fator de risco de Transtorno Bipolar.

A plataforma *UCSC Genome Browser Gateway* apresenta bancos de dados que compilam variantes associadas com fenótipo patogênicos, *Decipher*, e variantes ditas polimórficas presentes em população fenotipicamente não afetada, *DGV*. No *Decipher* foi observado que

esta região participa de um cluster com relatos de patogenicidade, cujo o fenótipo majoritariamente encontrado é a deficiência intelectual. Entretanto, outro cluster de alterações polimórficas também é observado para esta variante no *DGV*. Cabe ressaltar que no *DGV* as alterações relatadas são consideravelmente menores e predominantemente duplicações, enquanto que no *Decipher* as alterações são maiores e predominantemente deleções, demonstrando assim o efeito fenotípico dos tipos de alterações nessa região. Outros relatos de fenótipos também verificados para essa região são autismo, atraso na fala, malformações dentárias, alterações mandibulares e fenda palatina (*UCSC Genome Browser Gateway*, 2018; Toledo, 2016).

Duplicação desta região foi observada em duas pacientes com Síndrome de Rett, o que levou a proposição de que o gene *GPRIN2* seria um modulador de fenótipo nesta síndrome (Artuso *et al.* 2011). Como essa CNV foi observada tanto em indivíduos não afetados como em pacientes com deficiência intelectual, foi proposto que a mesma possa ser patogênica com penetrância incompleta ou uma CNV moduladora de expressão, não sendo assim a única alteração causativa dos fenótipos observados (Soueid *et al.*, 2016).

### ***Família XB7***

A amostra XB7M (41 anos) apresentou desvio de 78:22. O seu filho paciente XB7F apresenta, além de DI, dificuldades na fala, agressividade, microcefalia, baixa estatura e dismorfias. Possui um irmão afetado e relatos familiares de distúrbios psiquiátricos. A CMA do paciente revelou duas alterações provavelmente patogênicas e uma VOUS.

Dentre as provavelmente patogênicas, foi verificada uma deleção na região 16p12.2, onde está localizado o gene *OTOA*. Este gene codifica uma glicoproteína presente no tecido epitelial sensorial da orelha interna que, quando deletado em homozigose, causa surdez não-sindrômica (Zwaenepoel *et al.*, 2002). Assim, o paciente XB7 é portador de tal mutação, mas não manifesta fenótipo.

Já a deleção encontrada na região 1q21.1 tem significado incerto, pois apresenta deleção parcial de genes da família *NBPF* e do gene *PDE4DIP*, considerados não patogênicos pela plataforma OMIM. Os genes da família *NBPF* são enriquecidos em sequências codificantes para o domínio DUF1220, expresso principalmente em neurônios. O número de cópias para esse domínio encontra-se altamente expandido em humanos e reduzido em outros primatas, sugerindo um papel evolutivo no desenvolvimento cerebral humano (Popesco *et al.*, 2006).

Mesmo que haja estudo associando o número de cópias de DUF1220 com tamanho do cérebro e desenvolvimento cortical (Zimmer & Montgomery, 2015), o seu papel e patogenicidade não são completamente claros.

Porém, há estudos que associam número de cópias e deleções deste domínio com autismo e esquizofrenia (Davis *et al.*, 2015; Mefford *et al.*, 2008; Stefansson *et al.*, 2008), entretanto as deleções relatadas são consideravelmente maiores que a observada em XB7. Ambas as plataformas, *Decipher* e *DGV*, apresentam um grande número de entradas para a região, porém em ambas o predomínio é de duplicações, porém com relatos de deleções, sugerindo assim uma possível penetrância incompleta das alterações. Ambos os genes *NBPF* e *PDE4DIP* foram vistos como associados também com neuroblastomas e neoplasias mieloproliferativas, demonstrando também o possível papel desta variante na suscetibilidade ao câncer (Andries *et al.*, 2015; Wilkinson *et al.*, 2003)

A segunda variante considerada provavelmente patogênica encontrada neste paciente mostra uma duplicação em Xq28 abrangendo os genes *SLC6A8*, *BCAP31* e *ABCD1*. A patogenicidade desses genes ocorre quando em haploinsuficiência, situação oposta à encontrada. Porém, o *breakpoint* distal desta duplicação ocorre entre os éxons 5 e 6 do gene *ABCD1*, que possui um total de 10 éxons. O gene *ABCD1* codifica uma proteína transportadora de membrana dependente de ATP do peroxissomo, que é responsável por internalizar ácidos graxos de cadeias longas para degradação por meio de beta-oxidação. Mutações neste gene impedem tal internalização levando ao acúmulo desses ácidos graxos em tecidos, afetando principalmente a mielinização de tecidos do sistema nervoso e o córtex adrenal, ocasionando na doença Adrenoleucodistrofia (Aubourg *et al.*, 1993). Entretanto, este não é o fenótipo observado neste paciente. É possível que a perturbação da estrutura deste gene ocasionou em transcrito e proteína diferentes, mas ainda capaz de recapitular pelo menos parte do fenótipo esperado e resultando em um quadro clínico mais brando. Ou ainda, esta perturbação ocasionaria na forma adulta da doença, que é precedida por sintomas psiquiátricos, algo recorrente na família do paciente. Assim, será sugerido aos médicos geneticistas responsáveis a observação do paciente para identificar possíveis sintomas de progressão desse fenótipo.

### ***Família XB8***

A amostra XB8M (41 anos) apresentou proporção de inativação de 74:26, sendo que o filho XB8F não herdou o alelo preferencialmente inativado. O quadro clínico do paciente

apresenta microcefalia, atrofia cerebral, dismorfias faciais e dermatite psoriasiforme espongiótica com componente liquenóide. Possui irmãs sadias e um irmão com tetraparesia espástica, microcefalia e paquigiria. Não foram encontradas alterações no exame de CMA, entretanto neste paciente também foi conduzido o exame de exoma, onde foi verificado uma variante possivelmente patogênica para o gene *LICAM* (c.1897G>A (p.Val633Met)), também situado na região Xq28. Este gene codifica uma glicoproteína pertencente a uma classe de imunoglobulina de moléculas de adesão celular (CAMs). L1CAM é encontrada principalmente no sistema nervoso e é também considerada uma proteína de reconhecimento neural, assim como orientação de crescimento, migração e sobrevivência neuronal no desenvolvimento, sinaptogênese, mielinização e LTP (Kenwrick *et al.*, 2000). Há uma variabilidade na expressão, mesmo para a mesma mutação em *LICAM*, causando fenótipos de síndrome MASA ou hidrocefalia (Kaepernick *et al.*, 1994), e quando o fenótipo é manifestado como uma associação de ambos e com agenesia do corpo caloso, se caracteriza a síndrome CRASH (Yamasaki *et al.*, 1997).

A proporção de desvio observada na mãe XB8M está na classe <75:25 de desvio de inativação do cromossomo X, uma classe muitas vezes considerada como limítrofe. Considerando que *LICAM* possui expressão bialélica em mulheres (Carrel & Willard, 2005), não seria esperado que o desvio observado fosse resultante de seleção celular durante a embriogênese, mas possivelmente de um processo estocástico. Assim, sugere-se que a alteração em epígrafe não tenha relação com inativação do X, contrariando o proposto por Kaepernick *et al.* (1994). Esses autores relataram desvios em portadoras de mutação, porém, essas mulheres tinham idade avançada (mãe e irmã de paciente de 60 anos), o que poderia sugerir que o desvio não estava relacionado com as alterações observadas e sim com idade.

### 3.3. Demais considerações

Das 36 famílias analisadas, 10 são provenientes de Unaí (MG) e proximidades, isso é, cerca de 28% da amostra, sendo que dessas, quatro estão presentes entre as amostras que apresentaram desvio (40%). Estudo anterior sobre análise da síndrome do X frágil em pacientes do HUB verificou uma frequência aumentada de pacientes provenientes de Unaí, sugerindo que essa cidade tenha uma prevalência de DI acima da média. Porém, naquele trabalho não foi observada ancestralidade comum das famílias com casos de DI (Fritsch, 2011). Da mesma forma, o presente estudo não verificou um padrão de variantes entre os pacientes de Unaí. Ainda assim é curioso o fato de que essa cidade de ~84 mil habitantes (IBGE, 2017) apresenta a

frequência elevada em estudos de deficiência intelectual ligada ao X em um hospital do Distrito Federal, que possui ~3 milhões de habitantes (IBGE, 2017). Isto pode ser decorrente somente da proximidade de Unaí com a cidade de Brasília, aparentando uma representatividade de famílias afetadas aparentemente acima da média, como também um possível efeito do fundador nessa cidade, que foi formada a partir de poucas famílias no século XIX.

Dentre as amostras com desvio, dois pacientes apresentaram alterações na pele: manchas hipercrômicas e dermatite psoriasiforme. Isto é decorrente do fato de que tecidos do sistema nervoso e pele possuem origem no mesmo folheto embrionário, o ectoderma. Assim tais alterações devem ser sempre levadas em consideração durante a realização do diagnóstico de pacientes para melhor caracterizar a síndrome em questão.

Foram vistas três alterações patogênicas na região Xq28 em três pacientes distintos neste trabalho. Estas observações podem ser justificadas pela: i) densidade de genes responsáveis pelo desenvolvimento do sistema nervoso nesta região o que afeta a proliferação celular durante a embriogênese. ii) instabilidade da cromatina nesta região, ocasionando em maior número de duplicações e deleções. A porção distal de Xq28 apresenta várias sequências repetitivas (Aradhya *et al.*, 2002), uma característica encontrada em regiões com alta taxa de recombinação. Além disso, durante a evolução esta região teve um cluster gênico duplicado para a região pericentromérica de 16p11.1, onde foram encontradas estruturas gênicas de *SLC6A8* (Eichler *et al.*, 1996), facilitando assim a recombinação homóloga não-alélica. É importante ressaltar que o paciente XB7F apresentou duplicações simultâneas em ambas as regiões (como reportado no Apêndice II), incluindo o gene *SLC6A8*, podendo explicar assim o mecanismo que ocasionou tais duplicações.

Estes resultados apontam a importância do uso de CMA como um teste primordial na análise de pacientes com DI, mas com uso associado de outras tecnologias disponíveis para diagnóstico, como MLPA, exoma ou NGS, que nos últimos anos vêm identificando com mais eficiência genes responsáveis pelos fenótipos de XLID (Muthusamy *et al.*, 2017).

#### **4. CONCLUSÕES**

Neste trabalho foi analisado se o conhecimento do padrão de inativação do cromossomo X poderia sugerir a presença de alterações estruturais e/ou mutações. Para tanto, estimamos as frequências de proporção de inativação em uma amostra potencialmente portadora de mutação e/ou alteração estrutural relacionada com deficiência intelectual ligada ao X. Foi constatado que

há a presença de desvios no padrão de inativação nesta amostra, porém sem diferença estatística da população controle. Dados da literatura apontam para que mutações no cromossomo X estejam associadas a desvios de inativação. Aqui foi possível elucidar essa proposta para certos casos e para outros não. Como exemplo, não ficaram explícitos os papéis das VOUS na manifestação do desvio, demonstrando a necessidade do uso de outras análises moleculares para complementação.

É importante evidenciar que o critério de inclusão das amostras foi heredograma sugestivo de padrão de herança ligada ao X, uma análise indireta, e não é possível afirmar com exatidão se todas as mulheres possuem mutações patogênicas no cromossomo X. Assim, há a possibilidade de que portadoras de mutações patogênicas autossômicas integrem esta amostra devido a essa limitação.

Desta forma, o papel do desvio de inativação no aconselhamento genético de deficiência intelectual ligada ao X é passível de discussão. Mesmo sendo uma alternativa acessível, não foi vista associação que poderia auxiliar na triagem de pacientes para exames moleculares que avaliam o cromossomo X mais detalhadamente, não podendo assim ser considerada a melhor alternativa para esse propósito.

**Capítulo II - Inativação do cromossomo X e associação  
com portadoras de mutação para câncer**

## 1. INTRODUÇÃO

Desde que um estudo há duas décadas observou que o produto do gene *BRCA1* apresenta associação física com o cromossomo X, que está inativo, nos espermatozóides no paquíteno (Scully *et al.*, 1997), diversos outros estudos investigaram se ocorreria essa mesma associação com o cromossomo X inativo em mulheres. Determinados estudos tiveram sucesso na confirmação dessa hipótese (Diaz-Perez *et al.*, 2006; Ganesan *et al.*, 2002, 2004; Jazaeri *et al.*, 2004; Silver *et al.*, 2007), enquanto outros a refutaram completamente (Xiao *et al.*, 2007) e parcialmente (Chadwick & Lane, 2005; Pageau *et al.*, 2007).

De acordo com autores que verificaram a associação do produto do gene *BRCA1* com o cromossomo X inativo, *BRCA1* está colocalizado com marcadores de inatividade do X, como a macroH2A, e se associa com *XIST*. Ainda, a ausência de *BRCA1* ocasiona instabilidade na heterocromatina, incluindo a falta de formação de nuvem de *XIST* no X inativo. Por outro lado, sua superexpressão leva à diminuição da expressão de genes do X, principalmente os situados em Xp11, sugerindo o seu papel na manutenção da inativação (Jazaeri *et al.*, 2004). Entretanto, a reprodutibilidade destes achados foi contestada principalmente por Xiao *et al.* (2007), que não observaram nenhuma das associações, enquanto que Chadwick & Lane (2005) afirmam que a interação de *BRCA1* com o X tem um aspecto transiente, sendo concomitante com a forquilha de replicação na fase S, assim como acontece com cromossomos autossômicos. Pageau *et al.* (2007) propuseram que a instabilidade na heterocromatina é um efeito indireto da ausência de *BRCA1*, causado pela expressão anormal do genoma durante a tumorigênese. Contudo, mais recentemente, Broering *et al.* (2014) evidenciaram que o estabelecimento da heterocromatina pericêntrica de X é dependente de *BRCA1* durante a formação do domínio nuclear de XY na meiose, colocando ainda mais em debate a associação de *BRCA1* com a inatividade de X.

Apesar de toda essa discussão, há o consenso de que o desaparecimento do corpúsculo de Barr é uma característica frequentemente observada em diversos tipos de tumores, resultando na exibição de padrões anormais de expressão gênica (Carone & Lawrence, 2013; Chaligné & Heard, 2014; Kang *et al.*, 2015; Pageau *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2017). Por exemplo, os antígenos câncer-testículo (CTAs) são proteínas que são expressas exclusivamente em células germinativas masculinas, sendo que muitos dos seus genes estão localizados no cromossomo X (Scanlan *et al.*, 2002), sendo epigeneticamente regulados (Kang *et al.*, 2015). A perda do status de inativação no câncer leva à expressão anormal dessas proteínas, servindo assim como um antígeno de localização do tumor em imunoterapia. Foi

visto que especialmente quatro genes CTAs são superexpressos com a hipometilação, e que isto está associado com um prognóstico menos favorável em adenocarcinoma ovariano seroso, sugerindo que esses genes têm influência na agressividade do câncer (Kang *et al.*, 2015).

Contudo, os mecanismos que levam a ausência de heterocromatina do X não são muito bem esclarecidos. Foi visto que a falta de inativação do X na oncogênese é independente de BRCA1 e XIST e é resultante da replicação do X ativo. Não haveria assim no tumor a reativação do X previamente inativo, e sim que este seria perdido durante as divisões celulares (Sirchia *et al.*, 2005). Um estudo também testou a deleção de *Xist* em linhagens sanguíneas de camundongos, resultando no aparecimento de uma forma invasiva de câncer hematológico em fêmeas, o que contribuiria para explicar a alta frequência deste câncer em mulheres (Yildirim *et al.*, 2013). Todavia, a reativação do cromossomo X é tida como a causa mais provável em outros estudos, como analisado mais detalhadamente por Chaligné *et al.* (2015). Este grupo verificou que há uma erosão das marcas epigenéticas do X inativo em células de câncer de mama, ocorrendo perda de repressores de expressão, como H3K27me3 e metilação de promotores. Associado a isso, a conformação 3D da cromatina apresentou-se altamente modificada. Cabe ressaltar que nenhum dos mecanismos de perda de inativação podem ser desconsiderados devido à heterogeneidade que tumores apresentam, tanto dentro de um mesmo tecido quanto em progressão (Hysolli *et al.*, 2012). O que é possível concluir, no momento, é que o desaparecimento do corpúsculo de Barr pode ser considerado um biomarcador no câncer (Chaligné *et al.*, 2015).

Quanto a padrões de desvio de inativação do cromossomo X em associação ao câncer, a literatura também apresenta resultados contrastantes. Há especial atenção para o câncer de mama e câncer de ovário, justamente pela proposta interação de BRCA1 com XIST previamente relatada. Buller *et al.* (1999) foram os primeiros a propor a ocorrência de associação do desvio com uma forma invasiva de câncer ovariano e com mutações em *BRCA1*. Em seguida, foi observado que há uma frequência elevada de desvio de inativação em pacientes com câncer de mama não associado ao BRCA1 e ausência de associação em pacientes com *BRCA1/BRCA2* mutados (Kristiansen *et al.*, 2002; Kristiansen *et al.*, 2005b). Enquanto que outro trabalho verificou que o desvio ocorre com maior frequência em portadoras de mutação em *BRCA1* não afetadas, particularmente associado à manifestação tardia do câncer, quando em comparação a indivíduos controle ou a pacientes afetadas por manifestação precoce de câncer (Lose *et al.*, 2008). Mais recentemente, Manoukian *et al.* (2013) não verificaram a associação do desvio em nenhuma das situações, seja em portadoras de mutação ou com a

agressividade do câncer, sugerindo que a estimativa do padrão de inativação não é uma boa proposta a ser utilizada durante o diagnóstico de câncer.

Desta forma, havendo uma literatura tão divergente em dados cabe a necessidade de novos estudos nesta área. Para tanto, a proposta aqui apresentada foi identificar possíveis associações do desvio de inativação do cromossomo X e câncer, representadas por probandas não afetadas, porém com histórico familiar, assim como em mulheres com câncer de mama diagnosticados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostra**

Foram analisadas 241 amostras de DNA obtidas em coletas anteriores (Brandão, 2015; Toledo, 2016) do Laboratório de Genética Humana da Universidade de Brasília e do Laboratório de Polimorfismos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina por meio de colaboração. Todas as amostras eram provenientes de indivíduos do sexo feminino. Com isso, foram constituídas três amostras para o presente estudo: amostra controle; amostra caso 1 – histórico familiar de câncer; amostra caso 2 – pacientes com diagnóstico de câncer de mama. As amostras controle e caso de histórico familiar de câncer (amostra caso 1) foram organizadas a partir das informações dos questionários coletados por Brandão (2015) e Toledo (2016).

#### **2.1.1 Critérios de inclusão**

Para a composição das amostras colocou-se como critério básico que fossem indivíduos do sexo biológico feminino, com idade acima de 18 anos e sem fenótipo com relação a síndromes. Além disso, foram estabelecidos como critérios de inclusão:

##### **Amostra controle**

- Heredograma não sugestivo de histórico familiar de câncer

##### **Amostra caso 1**

- Heredograma sugestivo de padrão de herança de câncer familiar

##### **Amostra caso 2**

- Diagnóstico de câncer de mama

## 2.2 Análise do padrão de inativação do cromossomo X

Foi utilizado o mesmo protocolo adaptado de Allen *et al.* (1994) previamente descrito no capítulo I, página 15, para verificar o perfil de metilação do STR localizado no gene *AR*.

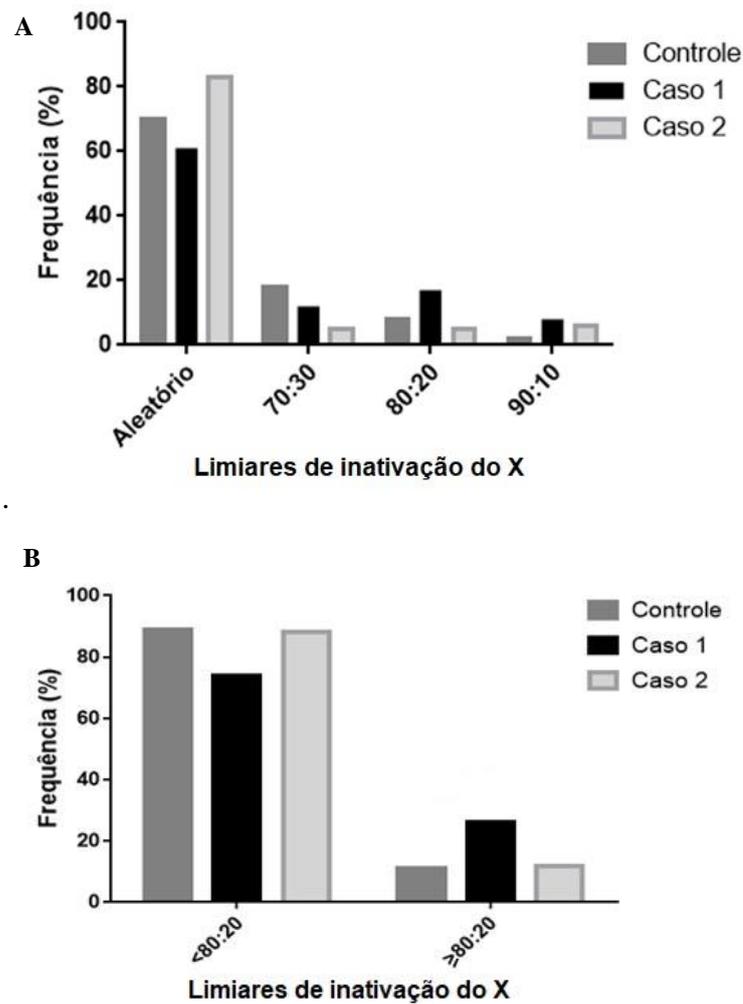
## 2.3 Análise estatística

Os dados de proporção de inativação (<80:20 e ≥80:20) de grupos caso 1 e 2 foram comparados aos de controle utilizando os testes de  $\chi^2$  e Regressão Logística, cujo resultado é o valor de odds ratio. Nos testes onde o número de indivíduos era <5, foi utilizado o teste exato de Fisher.  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo para estes testes. As comparações estatísticas também foram conduzidas em amostra estratificada em dois grupos obedecendo ao limiar de 50 anos, assim como para grupos de tipos de histórico de câncer. O limiar de 50 anos foi adotado devido ao baixo número de mulheres acima de 60 anos nesta amostra, onde então não seria possível realizar testes estatísticos significantes.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na amostra total estudada (n=241), observou-se que 12,2% apresentaram o limiar de 70:30, sendo que os valores mais extremos de desvio apresentaram valores de 9,3% (80:20) e 5,3% (90:10). A figura II.1 e tabela II.1 mostram os dados relativos à avaliação de inativação do cromossomo X quando a população total é dividida em três grupos: controle, caso 1 (histórico familiar de câncer) e caso 2 (presença de diagnóstico de câncer de mama). Quando se considera o limiar de 80:20, observou-se uma frequência de desvio de inativação na amostra controle de ~11%, enquanto que na amostra caso 1 foi de ~26% e na amostra caso 2, ~12%. A amostra caso 2 apresentou 12,7% de taxa de homozigose e ~3% não obtiveram amplificação após a digestão, sendo que essas amostras não foram informativas e foram retiradas do n amostral.

Houve diferença estatística entre a amostra caso 1 e a controle, o que não foi observado para a amostra caso 2. As frequências obtidas na população controle foram similares aos controles previamente descritos na literatura (Amos-Landgraf *et al.*, 2006), nos quais desvios acima de 80:20 correspondem a ~10% da população não afetada. Assim, conclui-se que esta amostra foi representativa o suficiente da população.



**Figura II.1.** Frequências de proporção de inativação obtidas em amostras controle, caso 1 e caso 2. A) Frequências de proporção quando considerados três limiares de desvio ( $\geq 70:30$ ,  $\geq 80:20$  e  $\geq 90:10$ ). B) Frequências de proporção quando se considera o limiar de 80:20.

**Tabela II.1.** Teste de associação por  $\chi^2$  e odds ratio (OR) entre as amostras com limiares aleatório (<80:20), e com desvio  $\geq 80:20$  observadas em amostra controle, histórico familiar de câncer (Caso 1) e diagnóstico de câncer de mama (Caso 2).

Proporção de inativação	Controle	Caso 1	Caso 2
Aleatório	96	54	53
80:20	12	19	7
n	108	73	60
$\chi^2$		6,828 (p=0,0089)	0,0119 (p=0,9132)
OR (95% CI)		2,8148 (1,2700 a 6,2389)	1,0566 (0,3923 a 2,8455)
		(p=0,0108)	(p=0,9133)

Quanto à taxa de homozigose observada neste trabalho na amostra caso 2 (12,7%), temos que esse STR apresenta uma taxa de heterozigose alta nas populações já analisadas. Amos-Landgraf *et al.* (2006), por exemplo, estudando uma amostra de 1.005 mulheres de diversas populações, e descrevendo sua amostra como sendo mista com relação a ancestralidade, reportaram uma taxa de 8%. Entretanto, a diferença de frequência aqui observada não significou diferença estatística, sendo que essa discreta diferença pode representar diferenças na constituição populacional entre as amostras.

Um outro dado observado na amostra caso 2 foi a falta de amplificação de ~3% das amostras após digestão, mesmo estas tendo o material não digerido amplificado. Esta ausência de amplificação não foi observada em nenhum dos outros grupos, incluindo a amostra caso do capítulo I. Isto pode ser tanto um artefato da técnica como pode refletir uma possível perda do X inativo nos leucócitos dessas pacientes afetadas por câncer de mama. Dois estudos prévios utilizando células de mucosa bucal verificaram que a frequência de corpúsculos de Barr era significativamente reduzida em pacientes com câncer, sendo que o primeiro (Kaur *et al.*, 2006) verificou tal associação em casos de câncer cervical e não observou o mesmo em pacientes com câncer de mama. Já o segundo (Natekar & de Souza, 2008) notou o oposto, constatando a redução do X inativo em pacientes com câncer de mama. Destaca-se que o  $n$  amostral do primeiro estudo era de 25 pacientes de câncer de mama, enquanto que o segundo apresentou dados de 100 pacientes, podendo considerar assim um resultado mais robusto.

Tendo em vista o viés idade, como previamente relatado na literatura (Busque *et al.*, 1996; Knudsen *et al.*, 2007), determinados estudos indicam o limiar de 60 anos para desvios mais extremos (Sandovici *et al.*, 2004), enquanto outros o de 50 anos (Lose *et al.*, 2008). Neste presente estudo o limiar de 50 anos foi suficiente para observar o aumento da frequência de desvios de inativação acima de 80:20 na população controle ( $\leq 50$  anos: ~7%;  $> 50$  anos: 30%), o que também foi observado na amostra caso 1 ( $\leq 50$  anos: 18%;  $> 50$  anos: 37%). A comparação entre controle e caso 1  $\leq 50$  anos mostrou diferença estatística (tabela II.2). Desvios de inativação podem ser adquiridos com a idade devido à diminuição de células-tronco no tecido hematopoiético em associação a eventos estocásticos e/ou seletivos (Sandovici *et al.*, 2006). Assim, um *pool* celular reduzido dá origem a todos os leucócitos circulantes, contribuindo para a observação do desvio em mulheres acima de 50 anos. Em resumo, nesse trabalho foi vista diferença significativa quando se comparou o grupo com e sem histórico de câncer na faixa etária abaixo de 50 anos, enquanto que a faixa etária acima de 50 anos mostrou similaridade entre as duas amostras. Considerando que um dos critérios para diferenciar câncer hereditário

de esporádico é o aparecimento do câncer precoce em comparação com a população geral, o encontro de um número maior de mulheres com desvio de inativação do cromossomo X no grupo amostral de proposta de câncer familiar abaixo de 50 anos, poderia sugerir que tais mulheres pudessem ter predisposição a câncer. Estudos adicionais são necessários para confirmar se estas mulheres apresentam mutação em genes de predisposição para câncer e validar a proposta de que avaliação de inativação do cromossomo X em familiar com histórico de câncer poderia sinalizar para uma potencial presença de mutação.

**Tabela II.2.** Teste de associação por  $\chi^2$  e odds ratio (OR) entre as amostras caso 1 e controle a partir da estratificação de idade em anos (limiar de 50 anos).

% de inativação do X	Faixa etária			
	≤50 anos		>50 anos	
	Controle	Caso 1	Controle	Caso 1
Aleatório	66	37	12	8
80:20	6	10	6	7
n	83	52	20	19
$\chi^2$	4,0936 (p=0,0430)		0,6092 (p=0,4350)	
OR (95% CI)	2,9730 (1,0003 a 8,8358) (p=0,0499)		0,7778 (0,4271 a 7,1712) (p=0,4368)	

Devido à diferença estatística observada entre os grupos caso 1 e controle, mesmo com a amostra pareada por faixa etária, foram também verificados os números de mulheres abaixo de 50 anos de acordo com o tipo de câncer observado. Dentre os tipos de cânceres relatados, foi então visto que dois tipos principais de histórico familiar de câncer compunham a amostra caso 1: câncer de mama e/ou ovário e câncer acometendo outros tecidos, como os do sistema digestório, sendo aqui considerado como “não mama/ovário”. Assim, o grupo caso 1 pôde ser parcialmente dividido em dois subgrupos, cujos valores obtidos encontram-se na tabela II.3. Por essa análise, foi verificado que mulheres com histórico de câncer de mama e/ou ovário não apresentaram diferença estatística quanto ao desvio de  $\geq 80:20$ , assim como o grupo de câncer não mama/ovário. Conclui-se assim que o tipo de câncer no grupo caso 1 não foi a variável que conduziu essa amostra a apresentar frequências divergentes às do controle.

**Tabela II.3.** Segmentação da amostra caso 1 da faixa etária de  $\leq 50$  anos em dois tipos de câncer e testes de associação por exato de Fisher e odds ratio (OR).

Proporção de inativação	Controle	Mama/Ovário	Não Mama/Ovário
Aleatório	77	20	26
80:20	6	4	3
n	83	24	28
Exato de Fisher		p=0,2265	p=0,6932
OR (95% CI)		2,5667 (0,6605 a 9,9746) (p=0,1735)	1,4808 (0,3454 a 6,3474) (p=0,5971)

As frequências de desvio de inativação similares às do grupo controle observadas no grupo de histórico de câncer “não mama/ovário”, sendo este composto principalmente por tipos de câncer no sistema digestório, apontam para outros achados mais recentemente relatados. Dunford *et al.* (2017) verificaram que alguns tipos de cânceres, os que apresentam uma proporção maior de homens afetados, teriam a sua etiologia relacionada a genes supressores de tumor localizados no cromossomo X e que escapam da inativação. Assim, homens possuem expressão monoalélica e mulheres expressão bialélica para esses genes, o que seria um fator de proteção para essas, tendo em vista que seriam necessários dois alelos mutados para a manifestação do câncer. Dentre os cânceres citados, os de sistema digestório estão inclusos. Neste caso, desvios de inativação não teriam papel na modulação de fenótipo e justificaria assim as frequências de desvio em valores próximos aos de controle neste grupo da amostra caso 1.

Quanto ao grupo de histórico de câncer de mama e/ou ovário, a ausência de associação vista não corrobora os achados de Lose *et al.* (2008), que observaram que portadoras de mutação de câncer de mama não afetadas apresentaram maior frequência de desvio de inativação, ao contrário de pacientes afetadas. Esses autores também sugeriram que o desvio de inativação estaria associado com uma possível manifestação tardia deste tipo de câncer, e não com manifestação precoce, como visto em outros estudos (Buller *et al.*, 1999; Kristiansen *et al.*, 2002; Kristiansen *et al.*, 2005b), o que também não foi observado nesta análise. Porém, foi vista associação previamente com a estratificação de idade. Pode-se apenas sugerir que a divergência das frequências do grupo caso 1 com a controle seja devido ao fato de que em casos de câncer familiar, a mutação estaria presente em todas as células somáticas, podendo assim ter efeito na inativação. Estima-se que para a amostra caso 2, cerca de 3% dos casos sejam de câncer hereditário (Cancer Research UK, 2018). Cânceres com mutações *de novo* são mais comuns

devido ao efeito ambiental, sendo que, nesses casos, as alterações estariam presentes apenas no tumor, não afetando assim o grau de inativação nas células de sangue periférico. Ainda, o presente trabalho tem como limitação o desconhecimento da etiologia genética do câncer de mama nestas pacientes e nos relatos de histórico, não podendo assim fazer inferências quanto ao papel de BRCA1 nos casos de desvios observados.

A discrepância entre os resultados de tantos trabalhos denota a limitação na reprodutibilidade destes estudos devido a tantos vieses que amostras de pacientes com câncer estão submetidas, seja quanto ao tecido afetado, tipo de tumor, agressividade na progressão do mesmo, idade, ancestralidade, dentre outros. O desvio de inativação do cromossomo X não indicou associação com a manifestação do câncer de mama, não podendo então ser proposto como uma alternativa na utilização de diagnóstico do mesmo. Houve associação com histórico de câncer, porém os fatores que contribuíram para essa associação ainda não estão esclarecidos. Portanto este achado requer estudos adicionais para propor a utilização da técnica de análise de inativação do cromossomo X em potenciais portadores de mutação para câncer, tendo em vista a natureza pleiotrópica de muitos genes localizados no cromossomo X e o seu possível papel na progressão dessas patologias.

#### **4. CONCLUSÕES**

Este estudo visou buscar associação entre desvios de inativação do cromossomo X e possíveis portadoras de mutação para câncer não afetadas e mulheres com diagnóstico de câncer de mama. Foi observada associação em mulheres com histórico de câncer familiar não afetadas quando considerou-se a faixa etária abaixo de 50 anos e nenhuma associação foi observada em mulheres afetadas por câncer de mama. Entretanto, a divisão da amostra em tipos de histórico de câncer não manteve a dita associação, não sendo assim a variável presente neste grupo que o fez divergir do controle em um primeiro momento. Tendo em vista a diversidade de outros trabalhos na literatura que não obtiveram o mesmo resultado, há espaço assim para discussão sobre a reprodutibilidade desses achados.

A utilização da análise de inativação do cromossomo X ainda é questionável para grupos portadores de mutações para câncer, já que a interação do cromossomo X com a etiologia genética destas doenças ainda não é bem esclarecida. Assim, são necessários outros estudos demonstrando os mecanismos pelos quais alterações em alguns genes autossômicos, como o *BRCA1*, podem afetar padrões de inativação, e como genes do cromossomo X podem modular fenótipos de câncer que não sejam causados por mutações diretamente neste cromossomo. A

partir desses resultados, então, seria possível estimar a contribuição da análise de inativação no diagnóstico e aconselhamento genético desses pacientes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os trabalhos apresentados nesta dissertação sob forma de capítulos buscaram identificar possíveis aplicações da análise de inativação do cromossomo X no diagnóstico e aconselhamento de pacientes afetados por deficiência intelectual ligada ao X e câncer. Foi visto que a utilização dessa ferramenta não se mostrou eficaz, pois há muitos vieses que acarretam em desvio e muitos fatores ainda desconhecidos que estão envolvidos no processo de silenciamento.

Quando utilizada essa proposta, cabe ao pesquisador e/ou geneticista reconhecer as diversas limitações que esta técnica envolve, dentre elas:

1) trata-se de uma análise indireta utilizando o status de metilação de um STR para estimar o padrão de metilação do cromossomo inteiro. Há alguns estudos que demonstram que nem sempre essa associação é verdadeira (Swierczek *et al.*, 2012).

2) quando o DNA se encontra degradado, o alelo menor apresenta amplificação preferencial, o que pode comprometer resultados de estudos de clonalidade (Mutter & Boynton, 1995).

3) técnica passível de muitos artefatos, tendo em vista o viés idade, possível hereditariedade dos padrões de inativação e a presença de desvios extremos mesmo em população não afetada.

4) não pode ser utilizada para estimar padrões em mulheres homozigotas para esse locus, descartando assim uma fração substancial da amostra.

5) não há consenso na literatura sobre a partir de qual limiar o desvio em si deve ser considerado. Desta forma, é aconselhável analisar a amostra sob vários padrões de cortes para não inferir associações inapropriadas. E se caso um único limiar deva ser considerado, o corte  $\geq 80:20$  é geralmente o mais utilizado devido à baixa frequência que a população controle apresenta.

6) Apenas um tecido (sangue periférico) é frequentemente utilizado para inferir o padrão de inativação total de um organismo, quando este, dependendo da mutação, pode ser tecido-dependente (Muers *et al.*, 2007).

Com o os resultados apresentados, o conhecimento dessas limitações e de tantos vieses que influenciam no desvio, o emprego dessa técnica como uma ferramenta de auxílio durante o processo de diagnóstico ou aconselhamento genético dos fenótipos relatados não é recomendado e passível de discussão. Apesar de ser economicamente acessível e de simples manipulação laboratorial, pode indicar resultados falso-positivos, influenciando negativamente no processo de diagnóstico e aconselhamento genético e requer demais estudos para propor uma utilização com melhor eficiência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R. C. *et al.* Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **American journal of human genetics**, v. 51, n. 6, p. 1229–39, 1992.
- AMERICAN ASSOCIATION OF INTELLECTUAL AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES (AAIDD); AAIDD. **Definition of Intellectual Disability**. Disponível em: [http://aaidd.org/intellectual-disability/definition#.Uk1F1BCGed4%5Cnhttp://aaidd.org/intellectual-disability/definition%23.VP\\_AVPnF-ao](http://aaidd.org/intellectual-disability/definition#.Uk1F1BCGed4%5Cnhttp://aaidd.org/intellectual-disability/definition%23.VP_AVPnF-ao).
- AMOS-LANDGRAF, J. M. *et al.* X Chromosome–Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females. **The American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 3, p. 493–499, 2006.
- ANDRIES, V. *et al.* NBPF1, a tumor suppressor candidate in neuroblastoma, exerts growth inhibitory effects by inducing a G1 cell cycle arrest. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 391, 10 dez. 2015.
- ARADHYA, S. *et al.* Physical and Genetic Characterization Reveals a Pseudogene, an Evolutionary Junction, and Unstable Loci in Distal Xq28. **Genomics**, v. 79, n. 1, p. 31–40, jan. 2002.
- ARTUSO, R. *et al.* Investigation of modifier genes within copy number variations in Rett syndrome. **Journal of human genetics**, v. 56, n. 7, p. 508–15, jul. 2011.
- AUBOURG, P. *et al.* Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. **Biochimie**, v. 75, n. 3–4, p. 293–302, 1993.
- AVNER, P.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 59–67, 1 jan. 2001.
- BÄCHNER, D. *et al.* Expression patterns of two human genes coding for different rab GDP-dissociation inhibitors (GDIs), extremely conserved proteins involved in cellular transport. **Human molecular genetics**, v. 4, n. 4, p. 701–8, abr. 1995.
- BALATON, B. P.; BROWN, C. J. Escape Artists of the X Chromosome. **Trends in Genetics**,

v. 32, n. 6, p. 348–359, 2016.

BEARD, C.; LI, E.; JAENISCH, R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. **Genes and Development**, v. 9, n. 19, p. 2325–2334, 1995.

BEUTLER, E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5058, p. 794–9, 8 maio 1992.

BIENVENU, T. *et al.* Non-specific X-linked semidominant mental retardation by mutations in a Rab GDP-dissociation inhibitor. **Human molecular genetics**, v. 7, n. 8, p. 1311–5, ago. 1998.

BOLDUC, V. *et al.* No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 1, p. 333–41, 2 jan. 2008.

BONNET, C. *et al.* Pure de-novo 5 Mb duplication at Xp11.22–p11.23 in a male: phenotypic and molecular characterization. **Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 9, p. 815–821, 10 set. 2006.

BOYD, Y. X Chromosome. *In: Encyclopedia of Genetics*. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 2145–2147.

BRANDÃO, D. L. M. Desvio de inativação do cromossomo X em mulheres brasileiras sem histórico familiar para deficiência intelectual ligada ao X. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

BROERING, T. J. *et al.* BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 205, n. 5, p. 663–675, 9 jun. 2014.

BROWN, C. J.; LAFRENIERE, R. G.; *et al.* Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 82–4, 1991a.

BROWN, C. J.; BALLABIO, A.; *et al.* A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, v. 349, p. 38–44, 1991b.

- BULLER, R. E. *et al.* Association Between Nonrandom X-Chromosome Inactivation and BRCA1 Mutation in Germline DNA of Patients With Ovarian Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 4, p. 339–346, 17 fev. 1999.
- BUSQUE, L. *et al.* Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. **Blood**, v. 88, n. 1, p. 59–65, 1996.
- BUZIN, C. H.; MANN, J. R.; SINGER-SAM, J. Quantitative RT-PCR assays show Xist RNA levels are low in mouse female adult tissue, embryos and embryoid bodies. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, p. 3529–3536, 1994.
- CANCER RESEARCH UK. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer/inherited-cancer-genes-and-increased-cancer-risk/family-history-and-inherited-cancer-genes>>. Acesso em: julho de 2018.
- CARONE, D. M.; LAWRENCE, J. B. Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. **Seminars in Cancer Biology**, v. 23, n. 2, p. 99–108, abr. 2013.
- CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**, v. 434, n. 7031, p. 400–404, 2005.
- CHADWICK, B. P.; LANE, T. F. BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. **Chromosoma**, v. 114, n. 6, p. 432–439, 21 dez. 2005.
- CHALIGNÉ, R. *et al.* The inactive X chromosome is epigenetically unstable and transcriptionally labile in breast cancer. **Genome Research**, v. 25, n. 4, p. 488–503, abr. 2015.
- CHALIGNÉ, R.; HEARD, E. X-chromosome inactivation in development and cancer. **FEBS Letters**, v. 588, n. 15, p. 2514–2522, 1 ago. 2014.
- CHEN, J. *et al.* A pilot study on commonality and specificity of copy number variants in schizophrenia and bipolar disorder. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 5, p. e824, 2016.
- CHEN, L. T.; GILMAN, A. G.; KOZASA, T. A candidate target for G protein action in brain. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26931–8, 17 set. 1999.

- CHIURAZZI, P.; PIROZZI, F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. **F1000Research**, v. 5, p. 599, 7 abr. 2016.
- CLEMSON, C. M. *et al.* XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: Evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. **Journal of Cell Biology**, v. 132, n. 3, p. 259–275, 1996.
- COMERTPAY, S. *et al.* Evaluation of clonal origin of malignant mesothelioma. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 301, 4 dez. 2014.
- D'ADAMO, P. *et al.* Mutations in *GDII* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. **Nature Genetics**, v. 19, n. 2, p. 134–139, 1 jun. 1998.
- DAVIS, J. M. *et al.* DUF1220 copy number is linearly associated with increased cognitive function as measured by total IQ and mathematical aptitude scores. **Human genetics**, v. 134, n. 1, p. 67–75, jan. 2015.
- DIAZ-PEREZ, S. V *et al.* A deletion at the mouse Xist gene exposes trans-effects that alter the heterochromatin of the inactive X chromosome and the replication time and DNA stability of both X chromosomes. **Genetics**, v. 174, n. 3, p. 1115–33, nov. 2006.
- DORUS, S. *et al.* Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of Homo sapiens. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 1027–40, 29 dez. 2004.
- DUNFORD, A. *et al.* Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. **Nature genetics**, v. 49, n. 1, p. 10–16, 2017.
- EICHLER, E. *et al.* Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 7, p. 899–912, 1 jul. 1996.
- FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397–406, fev. 2014.
- FRITSCH, P. M. Triagem molecular para síndrome do X frágil em pacientes com deficientes mental atendidos no HUB/UnB. 28 abr. 2011.

- FROYEN, G. *et al.* Loss of SLC38A5 and FTSJ1 at Xp11.23 in three brothers with non-syndromic mental retardation due to a microdeletion in an unstable genomic region. **Human Genetics**, v. 121, n. 5, p. 539–547, 28 jun. 2007.
- GANESAN, S. *et al.* BRCA1 Supports XIST RNA Concentration on the Inactive X Chromosome. **Cell**, v. 111, n. 3, p. 393–405, 1 nov. 2002.
- GANESAN, S. *et al.* Association of BRCA1 with the inactive X chromosome and XIST RNA. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1441, p. 123–8, 29 jan. 2004.
- GOKER-ALPAN, O. *et al.* Parkinsonism among Gaucher disease carriers. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 12, p. 937–940, 1 dez. 2004.
- GOKER-ALPAN, O. *et al.* Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders. **Neurology**, v. 67, n. 5, p. 908–910, 12 set. 2006.
- GRAVES, J. A. M. Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 33–46, 2015.
- HARRIS, J. C. **Intellectual disability: understanding its development, causes, classification, evaluation, and treatment.** [s.l.] Oxford University Press, 2006.
- HATAKEYAMA, C. *et al.* The dynamics of X-inactivation skewing as women age. **Clinical Genetics**, v. 66, n. 4, p. 327–332, 2004.
- HYSOLLI, E. *et al.* The lesser known story of X chromosome reactivation: a closer look into the reprogramming of the inactive X chromosome. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 2, p. 229–35, 15 jan. 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/por-cidade-estado-estatisticas.html?t=destaques&c=Brasil>>. Acesso em: julho de 2018.
- JAZAERI, A. A. *et al.* BRCA1-mediated repression of select X chromosome genes. **Journal of translational medicine**, v. 2, n. 1, p. 32, 21 set. 2004.
- JMOUDIAK, M.; FUTERMAN, A. H. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern

- management. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 2, p. 178–188, abr. 2005.
- KAEPERNICK, L. *et al.* Clinical aspects of the MASA syndrome in a large family, including expressing females. **Clinical Genetics**, v. 45, n. 4, p. 181–185, 1994.
- KANG, J. *et al.* Dysregulation of X Chromosome Inactivation in High Grade Ovarian Serous Adenocarcinoma. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118927, 5 mar. 2015.
- KAUR, S. *et al.* Buccal Mucosal X-chromatin Frequency in Breast and Cervix Cancer. **The Anthropologist**, v. 8, n. 4, p. 223–225, 17 out. 2006.
- KELSEY, A. D. *et al.* Impact of flanking chromosomal sequences on localization and silencing by the human non-coding RNA XIST. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 208, 2015.
- KENWRICK, S.; WATKINS, A.; ANGELIS, E. DE. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 6, p. 879–86, 12 abr. 2000.
- KNUDSEN, G. P. S. *et al.* Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, n. 1–2, p. 24–28, 2007.
- KRISTIANSEN, M. *et al.* High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients. **Journal of medical genetics**, 2002.
- KRISTIANSEN, M. *et al.* Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. **European journal of human genetics : EJHG**, 2005a.
- KRISTIANSEN, M. *et al.* High incidence of skewed X chromosome inactivation in young patients with familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. **Journal of medical genetics**, 2005b.
- LADANYI, M. Fusions of the SYT and SSX genes in synovial sarcoma. **Oncogene**, v. 20, n. 40, p. 5755–5762, 8 set. 2001.
- LEBRERO-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Altered expression of Butyrophilin (BTN) and BTN-like (BTNL) genes in intestinal inflammation and colon cancer. **Immunity, inflammation and disease**, v. 4, n. 2, p. 191–200, 2016.

- LEE, J.; DAVIDOW, L. S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. **Nature Genetics**, v. 21, n. 4, p. 400–404, 1999.
- LEE, J. T.; BARTOLOMEI, M. S. **X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease** *Cell*, 2013.
- LOSE, F. *et al.* Skewed X Chromosome Inactivation and Breast and Ovarian Cancer Status: Evidence for X-Linked Modifiers of BRCA1. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 21, p. 1519–1529, 5 nov. 2008.
- LUBS, H. A.; STEVENSON, R. E.; SCHWARTZ, C. E. REVIEW Fragile X and X-Linked Intellectual Disability: Four Decades of Discovery. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, p. 579–590, 2012.
- LYON, M. F. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v. 190, n. 4773, p. 372–373, 22 abr. 1961.
- MANOUKIAN, S. *et al.* X chromosome inactivation pattern in BRCA gene mutation carriers. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 5, p. 1136–1141, mar. 2013.
- MARAHRENS, Y. *et al.* Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. **Genes and Development**, v. 11, n. 2, p. 156–166, 1997.
- MAULIK, P. K. *et al.* **Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies** *Research in Developmental Disabilities*, 2011.
- MEFFORD, H. C. *et al.* Recurrent Rearrangements of Chromosome 1q21.1 and Variable Pediatric Phenotypes. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 16, p. 1685–1699, 16 out. 2008.
- MIGEON, B. R. *et al.* Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. **American journal of human genetics**, v. 69, n. 5, p. 951–60, 1 nov. 2001.
- MIGEON, B. R. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 12, p. 1428–33, 2006.

- MILLER, D. T. *et al.* Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749–764, 14 maio 2010.
- MINKS, J.; ROBINSON, W. P.; BROWN, C. J. **A skewed view of X chromosome inactivation** *Journal of Clinical Investigation*, 2008.
- MOREIRA DE MELLO, J. C. *et al.* Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10794, 7 dez. 2017.
- MUERS, M. R. *et al.* Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 6, p. 1138–49, jun. 2007.
- MUTHUSAMY, B. *et al.* Next-Generation Sequencing Reveals Novel Mutations in X-linked Intellectual Disability. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 21, n. 5, p. 295–303, 1 maio 2017.
- MUTTER, G. L.; BOYNTON, K. A. X chromosome inactivation in the normal female genital tract: implications for identification of neoplasia. **Cancer research**, v. 55, n. 21, p. 5080–4, 1 nov. 1995.
- NATEKAR, P. E.; DESOUZA, F. M. Reactivation of inactive X chromosome in buccal smear of carcinoma of breast. **Indian journal of human genetics**, v. 14, n. 1, p. 7–8, jan. 2008.
- NGUYEN, D. K.; DISTECHE, C. M. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. **Nature Genetics**, v. 38, n. 1, p. 47–53, 2006.
- OHNO, S. **Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1967. v. 1
- OKAMOTO, I. *et al.* Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 644–649, 30 jan. 2004.
- ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN® (OMIM). Disponível em: <<https://www.omim.org/>>. Acesso em: julho de 2018.

- ØRSTAVIK, K. H. Skewed X inactivation in healthy individuals and in different diseases. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement**, v. 95, n. 451, p. 24–9, 2006.
- PAGEAU, G. J. *et al.* The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 628–633, 2007.
- PAGEAU, G. J.; HALL, L. L.; LAWRENCE, J. B. BRCA1 does not paint the inactive X to localize XIST RNA but may contribute to broad changes in cancer that impact XIST and Xi heterochromatin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 4, p. 835–850, 1 mar. 2007.
- PEETERS, S. B.; YANG, C.; BROWN, C. J. Have humans lost control: The elusive X-controlling element. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 56, p. 71–77, 2016.
- PETROPOULOS, S. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 1012–1026, 5 maio 2016.
- PIENTA, K. J.; PARTIN, A. W.; COFFEY, D. S. Cancer as a Disease of DNA Organization and Dynamic Cell Structure. **Cancer Research**, v. 49, n. 10, p. 2525–2532, 1989.
- PITON, A.; REDIN, C.; MANDEL, J.-L. XLID-Causing Mutations and Associated Genes Challenged in Light of Data From Large-Scale Human Exome Sequencing. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 2, p. 368–383, 8 ago. 2013.
- PLENGE, R. M. *et al.* Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. **American journal of human genetics**, v. 71, n. 1, p. 168–73, 2002.
- POPESCO, M. C. *et al.* Human Lineage-Specific Amplification, Selection, and Neuronal Expression of DUF1220 Domains. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1304–1307, 1 set. 2006.
- RICHARDSON, A. L. *et al.* X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. **Cancer Cell**, v. 9, n. 2, p. 121–132, fev. 2006.
- SADO, T.; BROCKDORFF, N. Advances in understanding chromosome silencing by the long non-coding RNA Xist. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**.

**Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1609, p. 20110325, 2013.

SANDOVICI, I. *et al.* A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. **Human Genetics**, v. 115, n. 5, p. 387–92, 28 out. 2004.

SATO, K. *et al.* Genetics significance of skewed X-chromosome inactivation in premature ovarian failure. **American Journal of Medical Genetics**, v. 130 A, n. 3, p. 240–244, 2004.

SCANLAN, M. J. *et al.* Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. **Immunological reviews**, v. 188, p. 22–32, out. 2002.

SCULLY, R. *et al.* Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 265–75, 24 jan. 1997.

SHARMA, D. *et al.* Deciphering the Role of the Barr Body in Malignancy: An insight into head and neck cancer. **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 17, n. 4, p. e389–e397, nov. 2017.

SILVER, D. P. *et al.* Further Evidence for BRCA1 Communication with the Inactive X Chromosome. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 991–1002, 9 mar. 2007.

SIMMLER, M. C. *et al.* Mapping the murine Xce locus with (CA)<sub>n</sub> repeats. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 4, n. 9, p. 523–30, set. 1993.

SIRCHIA, S. M. *et al.* Loss of the Inactive X Chromosome and Replication of the Active X in *BRCA1* -Defective and Wild-type Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 6, p. 2139–2146, 15 mar. 2005.

SOUEID, J. *et al.* RYR2, PTDSS1 and AREG genes are implicated in a Lebanese population-based study of copy number variation in autism. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19088, 8 maio 2016.

STEFANSSON, H. *et al.* Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. **Nature**, v. 455, n. 7210, p. 232–236, 11 set. 2008.

SUDMANT, P. H. *et al.* Diversity of human copy number variation and multicopy genes.

**Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6004, p. 641–6, 29 out. 2010.

SWIERCZEK, S. I. *et al.* Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. **Blood**, v. 119, n. 13, p. e100–e109, 29 mar. 2012.

TOLEDO, R. DE C. P. Fenótipos complexos distintos e componentes genéticos coincidentes : um estudo sobre hipodontia e histórico familiar de câncer. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

TONON, L. *et al.* Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women. **British Journal of Haematology**, v. 102, n. 4, p. 996–1003, 1998.

UCSC GENOME BROWSER GATEWAY. Disponível em: <<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>>. Acesso em: julho de 2018.

VALLOT, C. *et al.* XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. **Nature Genetics**, v. 45, n. 3, p. 239–241, 20 mar. 2013.

VALLOT, C. *et al.* XACT Noncoding RNA Competes with XIST in the Control of X Chromosome Activity during Human Early Development. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 1, p. 102–111, jan. 2017.

VENOLIA, L. *et al.* Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 7, p. 2352–4, 1982.

VICKERS, M. A. *et al.* Assessment of mechanism of acquired skewed X inactivation by analysis of twins. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1274–81, 1 mar. 2001.

WILKINSON, K. *et al.* Cloning of the t(1;5)(q23;q33) in a myeloproliferative disorder associated with eosinophilia: involvement of PDGFRB and response to imatinib. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4187–90, 1 dez. 2003.

WOLF, S. F. *et al.* Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2806–10, 1984.

- XIAO, C. *et al.* The XIST Noncoding RNA Functions Independently of BRCA1 in X Inactivation. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 977–989, 9 mar. 2007.
- YAMASAKI, M.; THOMPSON, P.; LEMMON, V. CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. **Neuropediatrics**, v. 28, n. 3, p. 175–8, jun. 1997.
- YILDIRIM, E. *et al.* Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 727–42, 14 fev. 2013.
- ZARREI, M. *et al.* A copy number variation map of the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 3, p. 172–183, 3 mar. 2015.
- ZECHNER, U. *et al.* A high density of X-linked genes for general cognitive ability: A runaway process shaping human evolution? **Trends in Genetics**, 2001.
- ZHAO, J. *et al.* Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 750–756, 2008.
- ZIMMER, F.; MONTGOMERY, S. H. Phylogenetic Analysis Supports a Link between DUF1220 Domain Number and Primate Brain Expansion. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 8, p. 2083–8, 25 jun. 2015.
- ZWAENEPOEL, I. *et al.* Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6240–6245, 30 abr. 2002.

**APÊNDICE I**

**Tabela 1.** Proporção de inativação do cromossomo X em 36 indivíduos do sexo feminino com ao menos um filho afetado por deficiência intelectual com sugestivo padrão de herança ligado ao X selecionadas no Hospital Universitário de Brasília, Distrito Federal.

<b>Amostra</b>	<b>Proporção de Inativação do Cromossomo X</b>
XB1	100/0
XB2	100/0
XB3	86/14
XB4	83/17
XB5	80/20
XB6	78/22
XB7	78/22
XB8	74/26
XB9	72/28
XB10	72/28
XB11	67/33
XB12	64/36
XB13	64/36
XB14	64/36
XB15	61/39
XB16	61/39
XB17	60/40
XB18	58/42
XB19	57/43
XB20	55/45
XB21	54/46
XB22	52/48
XB23	51/49
XB24	51/49
XB25	51/49
XB26	50/50
XB27	49/51
XB28	48/52

---

XB29	48/52
XB30	46/54
XB31	46/54
XB32	45/55
XB33	43/57
XB34	Homozigótica
XB35	Homozigótica
XB36	Homozigótica

---

## APÊNDICE II

**Tabela 2.** CNVs benignas e provavelmente benignas encontradas em mães e em pacientes do Hospital Universitário de Brasília com heredrograma sugestivo de deficiência intelectual ligada ao X.

Interpretação	Tipo	Região	Tamanho (kbp)	Genes	Amostra
Provavelmente Benigna	Duplicação	1p36.32	420	<i>PRDM16, ARHGEF16, MEGF6, MIR551A, TPRG1L, WRAP73, TP73</i>	XB1M
Provavelmente Benigna	Duplicação	22q11.22	330	<i>POM121LIP, GGTL2, MIR650, MIR5571, IGLL5</i>	XB1M e XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	16p13.3	302	<i>LMF1, SOX8, SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSB2, TPSAB1, TPSD1</i>	XB1M
Provavelmente Benigna	Duplicação	12q24.33	335	<i>CHFR, LOC101928530, ZNF605, ZNF26, LOC101928597, ZNF84, ZNF140, ZNF891, ZNF10, ZNF268</i>	XB10F
Provavelmente Benigna	Duplicação	20q11.21	111	<i>DEFB115, DEFB116</i>	XB1M e XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	11p15.5	81	<i>MRPL23-AS1, LINC01219, HOTS, H19, MIR675</i>	XB1M e XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	19q13.2	15		XB1M e XB1F13
Provavelmente Benigna	Deleção	14q11.2	56		XB1M e XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	Xp22.33	325		XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	3p25.3	143	<i>HRH1, ATG7</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	7p14.1	101	<i>TARP, TRG-AS1</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	1p33	92	<i>AGBL4</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	9p23	46	<i>PTPRD</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	16q23.2	45		XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	22q12.3	36	<i>RASD2</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	11p11.12	36	<i>LOC440040</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	Xq26.3	36	<i>CT45A10, CT45A7</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	12p13.33	22	<i>CACNA1C</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	11q11	21	<i>TRIM48</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	13q21.1	20		XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	Xp21.3	14	<i>ILIRAPLI</i>	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	Xq23	13		XB1F

Provavelmente Benigna	Deleção	Xq12	7	AR	XB1F
Provavelmente Benigna	Deleção	Xq27.1	4		XB1F
Provavelmente Benigna	Duplicação	5p15.33	308		XB7.2
Provavelmente Benigna	Duplicação	16p11.2	284	<i>LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP</i>	XB7.2
Provavelmente Benigna	Deleção	11p14.3	201		XB7.2
Provavelmente Benigna	Deleção	9p21.2	207		XB3.2
Provavelmente Benigna	Deleção	1q44	175	<i>OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27</i>	XB3.2
Provavelmente Benigna	Deleção	9p21.2	195		XB3M
Provavelmente Benigna	Deleção	19p12	123	<i>ZNF826P</i>	XB3M
Provavelmente Benigna	Duplicação	9q32	201	<i>KIAA1958, INIP, SNX30</i>	XB10F
Provavelmente Benigna	Deleção	6p25.3	69	<i>DUSP22</i>	XB3F, XB5F e XB10F
Provavelmente Benigna	Perda de Heterozigose	Xp11.23	8.578	<i>CLCN5, MIR532, MIR188, MIR500A, MIR362, MIR501, MIR500B, MIR660, MIR502, AKAP4, CCNB3, DGKK, SHROOM4, BMP15, LINC01284, NUDT10, CXorf67, NUDT11, LINC01496, CENPVP1, CENPVP2, GSPT2, MAGED1, MAGED4B, MAGED4, SNORA11E, SNORA11D, MIR8088, XAGE2, XAGE1B, XAGE1E, SSX8, SSX7, SSX2B, SSX2, SPANXN5, XAGE5, XAGE3, FAM156B, FAM156A, GPR173, TSPYL2, KANTR, KDM5C, MIR6895, MIR6894, IQSEC2, SMC1A, MIR6857, RIBC1, HSD17B10, HUWE1, MIR98, MIRLET7F2, PHF8, FAM120C, WNK3, TSR2, FGD1, GNL3L, ITIH6, MAGED2, SNORA11, TRO, PFKFB1, APEX2, ALAS2, PAGE2B, PAGE2, FAM104B, MTRNR2L10, SNORA109, PAGE5, PAGE3, LOC100421746, MIR4536-1, MIR4536-2, MAGEH1, USP51, FOXR2, RRAGB, KLF8, UBQLN2, LINC01420, UQCRBP1, SPIN3, SPIN2B, SPIN2A, FAAH2, ZXDB, NLRP2B, ZXDA</i>	XB3M
Provavelmente Benigna	Perda de Heterozigose	11q12.3	6.405	<i>ASRGL1, SCGB1A1, AHNAK, EEF1G, MIR3654, MIR6747, TUT1, MTA2, EML3, ROM1, B3GAT3, GANAB, INTS5, C11orf98, LBHD1, METTL12, SNORA57, UQCC3, UBXN1, LRRN4CL, BSCL2, HNRNPUL2-BSCL2, GNG3, HNRNPUL2, TTC9C, ZBTB3, POLR2G, TAF6L, TMEM179B, MIR6748, TMEM223, NXF1, MIR6514, STX5, LOC105369332, WDR74, SNHG1, SNORD22, SNORD31, SNORD30, SNORD29, SNORD28, SNORD27, SNORD26, SNORD25, SLC3A2,</i>	XB3F

---

				<p><i>CHRM1, SLC22A6, SLC22A8, SLC22A24, SLC22A25, SLC22A10, SLC22A9, HRASLS5, LGALS12, RARRES3, HRASLS2, PLA2G16, ATL3, RTN3, C11orf95, C11orf84, MARK2, RCOR2, NAA40, COX8A, OTUB1, MACROD1, FLRT1, STIP1, FERMT3, TRPT1, NUDT22, DNAJC4, VEGFB, FKBP2, PPP1R14B, LOC105369340, PLCB3, BAD, GPR137, KCNK4, KCNK4-TEX40, TEX40, ESRRR, TRMT112, PRDX5, CCDC88B, MIR7155, RPS6KA4, MIR1237, LOC100996455, SLC22A11, SLC22A12, NRXN2, RASGRP2, PYGM, SF1, MAP4K2, MEN1, CDC42BPG, EHD1, MIR194-2HG, MIR192, MIR194-2, ATG2A, MIR6750, MIR6749, PPP2R5B, GPHA2, MAJIN, BATF2, ARL2, ARL2-SNX15, MIR6879, SNX15, SAC3D1, NAALADL1, CDCA5, ZFPL1, TMEM262, VPS51, TM7SF2, ZNHIT2, FAU, MRPL49, SYVN1, MIR6751, SPDYC, CAPN1, SLC22A20, POLA2, CDC42EP2, DPF2, TIGD3, SLC25A45, FRMD8, NEAT1, MIR612, MALAT1, SCYL1, LTBP3, SSSCA1-AS1, SSSCA1, FAM89B, EHP1L1, KCNK7, MAP3K11, PCNX3, MIR4690, SIPA1, MIR4489, RELA, KAT5, RNASEH2C, AP5B1, MIR1234, OVOL1, OVOL1-AS1, SNX32, CFL1, MUS81, EFEMP2, CTSW, FIBP, CCDC85B, FOSL1, C11orf68, DRAP1, TSGA10IP, SART1, EIF1AD, BANF1, CST6, CATSPER1, GAL3ST3, SF3B2, PACS1, KLC2, RAB1B, CNIH2, YIF1A, TMEM151A, CD248, RIN1, BRMS1, B4GAT1, LOC102724064, SLC29A2, NPAS4, MRPL11, PELI3, LOC101928069, DPP3, BBS1, ZDHHC24, ACTN3, CTSF, CCDC87, CCS, RBM14, RBM14-RBM4, RBM4, RBM4B, SPTBN2, C11orf80, RCE1, PC, LRFN4, MIR3163, C11orf86, SYT12, MIR6860, RHOD, KDM2A, GRK2, ANKRD13D, SSH3, LOC100130987, POLD4, CLCF1, RAD9A, PPP1CA, TBC1D10C, CARNS1, RPS6KB2, PTPRCAP, CORO1B, GPR152, CABP4, TMEM134, AIP, MIR6752, PITPNM1, CDK2AP2, CABP2, GSTP1, C11orf72, NDUFV1, DOC2GP, NUDT8, TBX10, ACY3, ALDH3B2, FAM86C2P, UNC93B1, ALDH3B1, NDUFS8, MIR7113, MIR4691, TCIRG1, MIR6753, CHKA, KMT5B, C11orf24, LRP5, PPP6R3, GAL, TESMIN</i></p>	
Provavelmente Benigna	Perda de Heterozigose	3p21.31	6.252	<p><i>TMIE, PRSS50, PRSS46, PRSS45, PRSS42, MYL3, PTH1R, CCDC12, NBEAL2, NRADDP, SETD2, KIF9-AS1, KIF9, KLHL18, PTPN23, SCAP, ELP6, CSPG5, SMARCC1, DHX30, MIR1226, MAP4, CDC25A, MIR4443, CAMP, ZNF589, FCF1P2, NME6, SPINK8, MIR2115, FBXW12, PLXNB1, CCDC51, TMA7, ATRIP, TREX1, SHISA5, PFKFB4, MIR6823, UCN2, COL7A1, MIR711,</i></p>	XB3F

---

				<p><i>UQCRC1, SNORA94, TMEM89, SLC26A6, MIR6824, CELSR3, MIR4793, CELSR3-AS1, NCKIPSD, IP6K2, PRKAR2A, PRKAR2A-AS1, SLC25A20, ARIH2OS, ARIH2, P4HTM, WDR6, DALRD3, MIR425, NDUFAF3, MIR191, IMPDH2, QRICH1, QARS, MIR6890, USP19, LAMB2, LAMB2P1, CCDC71, KLHDC8B, C3orf84, CCDC36, C3orf62, MIR4271, USP4, GPX1, RHOA, TCTA, AMT, NICN1, DAG1, BSN-AS2, BSN, APEH, MST1, RNF123, AMIGO3, GMPPB, IP6K1, CDHR4, FAM212A, UBA7, MIR5193, TRAI, CAMKV, MST1R, MON1A, RBM6, RBM5, RBM5-AS1, SEMA3F-AS1, SEMA3F, MIR566, GNAT1, SLC38A3, GNAI2, MIR5787, SEMA3B-AS1, SEMA3B, MIR6872, LSMEM2, IFRD2, HYAL3, NAT6, HYAL1, HYAL2, TUSC2, RASSF1, RASSF1-AS1, ZMYND10, NPRL2, CYB561D2, TMEM115, CACNA2D2, C3orf18, HEMK1, CISH, MAPKAPK3, MIR4787, DOCK3, MANF, RBM15B, DCAF1, RAD54L2, TEX264, GRM2, IQCF6, IQCF4, IQCF3, IQCF2, IQCF5-AS1, IQCF5, IQCF1, RRP9, PARP3, GPR62, PCBP4, ABHD14B, ABHD14A, ABHD14A-ACY1, ACY1, RPL29, DUSP7, LINC00696, POC1A, ALAS1, TLR9, TWF2, LOC101929054, PPM1M, WDR82, MIRLET7G, GLYCTK, GLYCTK-AS1, MIR135A1, DNAH1, BAPI, PHF7, SEMA3G, TNNC1, NISCH, STAB1, NT5DC2, SMIM4, PBRM1, GNL3, SNORD136, SNORD19, SNORD19B, SNORD69, GLT8D1, SPCS1, NEK4, ITIH1, ITIH3, ITIH4, ITIH4-AS1, MUSTN1, TMEM110-MUSTN1, TMEM110, MIR8064, SFMBT1</i></p>	
Provavelmente Benigna	Perda de Heterozigose	Xq11.1	5.135	<p><i>SPIN4, LINC01278, ARHGEF9, ARHGEF9-IT1, MIR1468, AMER1, ASB12, MTMR8, ZC4H2, ZC3H12B, LAS1L, FRMD8P1, MSN, MIR223, VSIG4, HEPH, EDA2R, AR</i></p>	XB3M
Benigna	Deleção	8p11.22	163	<p><i>ADAM5, ADAM3A</i></p>	XB6F, XB5F, XB3F, XB1M e XB1F
Benigna	Duplicação	14q32.33	477	<p><i>MIR4507, MIR4538, MIR4537, MIR4539, KIAA0125, ADAM6</i></p>	Todas

## **ANEXO I**

### **Coleta de material biológico e extração de DNA**

O material biológico utilizado foi sangue periférico, coletado com tubos Vacutainer contendo EDTA como anticoagulante, sendo que o procedimento foi realizado por um profissional da área de saúde devidamente treinado. A extração de DNA do sangue coletado seguiu a adaptação do protocolo do kit Puregene (Qiagen®).

Neste protocolo, foi utilizado 3ml de sangue, uma solução de lise de Red Blood Cell (RBC) MgCl<sub>2</sub> 1M e EDTA 0,5M e uma solução de lise celular (CLS) contendo EDTA 0,5M, Tris 1M pH 7.5 e SDS a 10%. O princípio desta técnica é a lise celular com um detergente aniônico na presença de um estabilizador de DNA, que estabiliza as atividades intracelulares e de DNases. O DNA genômico é precipitado com álcool e dissolvido e hidratado em uma solução de TE (0,5M EDTA, 1M Tris pH 7.5). A amostra de DNA final é estável e pode ser armazenada a 2–8°C, –20°C, ou –80°C.

Os 3ml de sangue foram adicionados a 9ml de RBC e o tubo deve ser invertido por 10 minutos e centrifugado por 10 minutos a 3400rpm em seguida. O sobrenadante foi dispensado e o pellet de células brancas foi mantido e vortexado. 3ml de CLS foram adicionados e misturados com uma pipeta pasteur. Em seguida, 1ml de solução de precipitado de proteína foi adicionado e vortexado por 20 segundos. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3400rpm. O sobrenadante obtido foi posicionado em um novo tubo falcon e a ele foi adicionado 3ml de isopropanol 100%. O tubo foi invertido por 2 minutos e deve ser centrifugado por 3 minutos a 3400rpm. O sobrenadante foi então dispensado e ao pellet foi adicionado álcool etílico 70%, que deve ser agitado. O tubo foi novamente centrifugado por 1 minuto a 3400rpm e o sobrenadante foi dispensado. Ao pellet foi adicionado o tampão TE e a hidratação deve ocorrer por pelo menos 24h.

## ANEXO II



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

## ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de Projeto:** CEP-FM 081/2009.

**Título:** "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

**Pesquisador Responsável:** Iris Ferrari.

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

**Aprovação**

**Não aprovação.**

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 28/10/2009.

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 25/11/2009.

## PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.

  
Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UNB