

JOSÉ OLIVEIRA DOS SANTOS

**ESTUDO DA DEFICIÊNCIA MENTAL DE
HERANÇA LIGADA AO CROMOSSOMO X**

(Versão Corrigida)

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética**

São Paulo

2013

Orientadora: Angela M. Vianna Morgante

OLIVEIRA DOS SANTOS, JOSÉ

**ESTUDO DA DEFICIÊNCIA MENTAL DE HERANÇA LIGADA AO
CROMOSSOMO X**

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Deficiência Mental
2. Deficiência Mental com Herança Ligada ao X
3. Microrrearranjos Cromossômicos
4. Inativação do Cromossomo X

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva

COMISSÃO JULGADORA

Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) concedido à orientadora (FAPESP-CEPID 98/14254-2) e bolsa da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) concedida ao aluno (CAPES-DS).

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho.

À Dra. Angela M. Vianna-Morgante, pela orientação neste projeto, por permitir que eu fizesse parte deste excelente grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim.

Ao Dr. Paulo Alberto Otto, pelos ensinamentos, pelo auxílio nas análises e por estar sempre disposto a ajudar no que fosse necessário. O exame clínico que realizou nos pacientes foi fundamental para este trabalho.

À Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pela colaboração durante todos os anos de minha pós-graduação, mostrando-se sempre solícita.

À Dra. Carla Rosenberg por todo apoio e pelas opiniões sempre relevantes e que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

À Dra. Débora Bertola, pela colaboração inestimável no exame clínico dos pacientes.

Aos doutorandos e amigos Adriano Bonaldi e Ana Carolina Fonseca, por estarem sempre dispostos a ajudar, fosse na realização de experimentos ou na análise e discussão de resultados, e por sermos um grupo unido e de convivência harmoniosa.

À mestre e especialista de laboratório Silvia S. da Costa, pelos ensinamentos e apoio técnico indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos colegas, que já passaram pelo laboratório, Larissa Fontes, Rafaela Nascimento, Sarita Badiglian e Karen Coqueti e à nova integrante do grupo Clarisse Ferreira, pela amizade e pela ajuda.

Aos técnicos do laboratório e amigos Fátima Caly, Maria Pinheiro, Ligia Vieira e Paulo Rogério de Camargo que sempre se mostraram solícitos, dispostos a fazer o que fosse possível para ajudar, e, dessa forma, contribuindo muito para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Maraisa Sebastião, pelo apoio durante todos esses anos, ajudando-me sempre que necessitei e pela dedicação na formatação dos textos deste trabalho.

Aos colegas e amigos Lilian Kimura, Renata Watanabe, Renata Thielli, Daniela Tiaki Uehara, Teresa Auricchio, Daniel Rincon, Ana Carla, Karina Lezirovitz, Vitor Dantas, Leandro Ucela, Uirá Souto, Dayane Cruz, Renan Lemes e Juliana Prior, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos familiares dos pacientes, pela colaboração.

À minha esposa Valéria e aos meus filhos Renato e Rodrigo, pelo amor, pelo apoio, pela compreensão e pelo incentivo que sempre me deram durante esses anos.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	2
I.1. Deficiência mental.....	2
I.2. Deficiência mental com herança ligada ao cromossomo X	3
I.3. Inativação do cromossomo X e deficiência mental.....	8
II. OBJETIVOS	13
III. PACIENTES E MÉTODOS	16
III.1. Pacientes	16
III.2. Métodos	16
III.2.1. Investigação de microdeleções e microduplicações no cromossomo X - <i>array-CGH</i> e <i>MLPA</i>	17
III.2.2. Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X - Análise de marcadores moleculares do tipo microssatélite	20
III.2.3. Análise de genes candidatos - sequenciamento direto	22
III.2.4. Sequenciamento de exomas	22
III.2.5. Análise do padrão de inativação do cromossomo X	23
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
IV.1. Famílias em que a deficiência mental tem padrão de herança ligada ao X	27
IV.1.1. FAMÍLIA 1	27
IV.1.2. FAMÍLIA 2	42
IV.1.3. FAMÍLIA 3	53
IV.1.4. FAMÍLIA 4	64
IV.2. Irmandade com dois ou mais indivíduos do sexo masculino com deficiência mental	75
V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	81
VI. ABSTRACT	87
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Deficiência Mental

A Deficiência Mental (DM) é definida como a incapacidade cognitiva caracterizada por limitações significativas nas funções intelectuais e no comportamento adaptativo, que se manifestam nas habilidades conceituais, sociais e práticas, originando-se antes dos 18 anos de idade (*World Health Organization, 1992; American Psychiatric Association, 1994*).

De acordo com o coeficiente de inteligência (QI) dos indivíduos afetados, a DM pode ser classificada em leve (QI entre 70 e 50), moderada (QI entre 50 e 35), grave (QI entre 35 e 20) e profunda (QI menor que 20). As formas moderada e grave têm frequência populacional de 0,3 a 0,5% e a forma leve, de 1 a 3%. A DM leve corresponde a aproximadamente 80-85% dos casos de DM e está geralmente associada a níveis socioeconômicos baixos; tem etiologia predominantemente multifatorial e a desnutrição aparece como sua principal causa ambiental. Já a DM moderada - profunda tem frequência semelhante nos diferentes níveis sociais, uma indicação do componente genético predominante em sua etiologia. As estimativas da frequência da DM variam entre diferentes estudos epidemiológicos, podendo atingir até 10% em países muito pobres, devido especialmente aos altos índices de desnutrição (*Chiurazzi e Oostra, 2000; Toniolo, 2000*).

As formas mais graves de DM geralmente estão associadas a outras manifestações clínicas, constituindo síndromes de múltiplas anomalias congênicas e DM. As formas sindrômicas de DM são aquelas que têm o diagnóstico etiológico mais frequentemente estabelecido. Entretanto, em cerca da metade dos casos de DM

moderada - profunda a causa permanece desconhecida. As principais causas genéticas de DM moderada - profunda são as anomalias cromossômicas e as mutações em genes únicos. Além das alterações cromossômicas detectáveis por técnicas citogenéticas convencionais, deleções e duplicações cromossômicas submicroscópicas (CNV, *Copy Number Variation*) foram mais recentemente identificadas como causa de cerca de 15 - 20% da DM em pacientes com cariótipo normal (revisão em Devriendt e Vermeesch, 2004; Rosenberg *et al.*, 2006).

I.2. Deficiência mental com herança ligada ao cromossomo X

Vários estudos em coortes de afetados por deficiência mental (DM) permitiram estimar que há 30%-40% mais afetados do sexo masculino (revisão em Mandel e Chelly, 2004; revisão em Ropers e Hamel, 2005). A observação de famílias em que a DM era claramente de herança ligada ao cromossomo X (DM-X) levou Lehrke (1972) a considerar mutações no cromossomo X como explicação para o excesso de homens afetados por DM em relação a mulheres, observação feita inicialmente por Penrose (1938). Essa possibilidade, sem dúvida, atraiu a atenção de vários grupos de pesquisa para a busca dos genes do cromossomo X relacionados à DM.

No momento da redação deste trabalho, eram conhecidos 85 genes no cromossomo X cujas mutações são responsáveis por DM síndrômica e 39 genes mutados na DM não síndrômica, dos quais 17 foram também associados a DM síndrômica. Assim, 107 genes do cromossomo X já tinham sido associados a DM. (Greenwood Genetic Center - XLMR Update, Novembro 2012). Nos autossomos, cerca de 400 genes tiveram mutações identificadas como causa de DM e, portanto, aproximadamente 16% dos genes já associados a DM estão no cromossomo X, que

contém apenas 5% dos genes humanos; essa proporção entre genes autossômicos e do cromossomo X identificados como causa de DM vem-se mantendo, não diferindo daquela estimada em 2004 por Inlow e Restifo.

Em parte, esse excesso de mutações relacionadas à DM, identificadas no cromossomo X, deve decorrer da maior facilidade no mapeamento de doenças causadas por mutações no cromossomo X e também do esforço de vários laboratórios de pesquisa para identificar a causa da DM-X. Entretanto, o real enriquecimento de genes relacionados à função cerebral no cromossomo X é assunto abordado por vários autores (Turner e Pardington, 1991; Graves *et al.*, 2002; Zechner *et al.*, 2001). Essa concentração de genes com papel na função cerebral no cromossomo X ocorreria como consequência da mais rápida fixação de mutações recessivas, sob seleção positiva, no cromossomo X em comparação aos autossomos (*Faster X Hypothesis*; Vicoso e Charlesworth, 2006). A observação de que genes do cromossomo X têm expressão maior no cérebro de mamíferos do que genes autossômicos, em comparação com tecidos somáticos, veio apoiar a hipótese de que genes importantes para a função cerebral concentraram-se no cromossomo X durante a evolução (Nguyen e Distèche, 2006). Como sintetizam Lubs *et al.* (2012), o macho XY pode ter sido o animal experimental e a fêmea XX, o armazém para mutações vantajosas e deletérias.

A síndrome mais frequente entre as síndromes de DM-X é a síndrome do X frágil (SXF), que resulta de mutação no gene *FMRI* (*Fragil X Mental Retardation 1*) e afeta um em cada 4.000-6.000 homens e uma em cada 8.000-9.000 mulheres (Crawford *et al.*, 2001). É responsável por aproximadamente 25% dos casos familiares de DM-X (Fishburn *et al.*, 1983) e, entre pacientes do sexo masculino com DM, a SXF tem frequência de aproximadamente 2,5% (Biancalana *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2007). Com base nessas frequências, estima-se que cerca de 10% dos indivíduos do sexo

masculino com DM têm uma forma de DM-X (Ropers e Hamel, 2005). Esses 10% estão longe de explicar o excesso de cerca de 30% de homens com DM em relação às mulheres. Diferenças no desenvolvimento embrionário do homem e da mulher, tornando os homens mais susceptíveis a agressões ambientais, ou polimorfismos no cromossomo X associados a outros fatores são possibilidades aventadas para explicar a fração da DM no sexo masculino que não seria decorrente de mutações em genes únicos do cromossomo X (Mandel e Chelly, 2004).

Diante da reconhecida importância das mutações em genes do cromossomo X como causa de DM-X, concentraram-se esforços para a identificação desses genes, aplicando-se diferentes estratégias. A abordagem mais utilizada e que permitiu a identificação da maioria dos genes relacionados à DM-X (39,1%) foi o estudo de ligação, utilizando marcadores moleculares, e a subsequente análise dos genes candidatos. Em algumas famílias pequenas, o uso de marcadores moleculares, permitindo a exclusão de segmentos do X não associados à doença, também tem permitido a identificação do gene mutado. Esse foi, por exemplo, o caso do estudo em nosso laboratório que levou à identificação de mutação no gene *UBE2A* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2A*) como causa de nova síndrome de DM-X (Nascimento *et al.*, 2006). A análise dos pontos de quebra de translocações X-autossomo em mulheres afetadas por DM e de outras alterações estruturais do cromossomo X associadas a DM também tem sido produtiva, indicando genes alterados pelas quebras (27,6 %). Outra estratégia há muito utilizada é a busca de mutações num gene, com base no defeito metabólico (6,7%) ou na via molecular (5,7%), cuja associação com a doença tenha sido verificada. Outras estratégias foram introduzidas mais recentemente, como a busca de microdeleções e microduplicações cromossômicas, com a utilização de *arrays* genômicos (3,8%). O sequenciamento global de regiões codificadoras de genes do

cromossomo X em famílias com DM-X permitiu a identificação de 17,1% dos genes mutados já identificados (Greenwod Genetic Center - XLMR Update, Novembro 2012). Ao longo dos últimos cinco anos, observa-se um aumento contínuo no número de genes relacionados a DM-X identificados, consequência dos avanços nas técnicas de sequenciamento (revisão em Lubs *et al.*, 2012).

Quando se consideram os genes do cromossomo X já relacionados a DM, verifica-se que suas mutações não são suficientes para explicar os 10% estimados de DM-X. Excetuando o gene *FMRI*, cuja mutação causa a síndrome do X frágil, as mutações nos genes no cromossomo X já associados a DM ocorrem com frequências baixas tanto nas famílias com padrão de herança ligada ao X como entre os casos isolados. No estudo (de Brouwer *et al.*, 2007) de 600 famílias do banco de famílias com DM-X do *EuroMRX Consortium*, não incluindo a síndrome do X frágil, mutações em 90 genes do cromossomo X anteriormente associados a DM foram detectadas em cerca de 42%, das famílias com afetados em diferentes gerações, indicando herança ligada ao X; portanto, quando se considera que as famílias com a síndrome do X frágil representam 25% das famílias com DM-X, as mutações detectadas explicariam cerca da metade dos casos de DM-X. Nesse mesmo estudo, 17% das famílias com afetados em apenas uma irmandade tiveram a DM explicada por mutações no cromossomo X e, entre os casos isolados de DM, apenas 1,4%. Os autores estimaram que, excluindo-se o *FMRI*, os genes mais frequentemente alterados - *ARX* (*Aristaless Related Homeobox*), *MECP2* (*Methyl CpG binding protein 2*), *PQBPI* (*Polyglutamine binding protein 1*) e *SLC6A8* (*Solute carrier Family 6 neurotransmitter transporter creatine, member 8*) - contribuam para 20% dos casos familiares de DM-X e para 1,4% dos casos isolados de DM no sexo masculino.

Tarpey *et al.* (2009) empreenderam um grande esforço para identificar genes mutados em 208 famílias em que a deficiência mental segregava com um padrão indicativo de herança ligada ao cromossomo X, realizando o sequenciamento de exons de 718 genes do cromossomo X, cobrindo cerca de 65% da região codificadora do cromossomo X. Esse estudo identificou nove novos genes associados a DM-X, mas a mutação causal só foi identificada em 25% das famílias. Esse número relativamente pequeno de mutações detectadas pode ter diversas explicações: a não detecção de variações no número de cópias do DNA, a localização das mutações em genes não sequenciados ou em regiões não estudadas nos genes, como íntrons, regiões reguladoras ou outras regiões não codificadoras ou ainda a inclusão de famílias que não teriam DM-X, pois havia famílias com afetados apenas em irmandades.

As dificuldades na avaliação do significado patogênico de substituições de par de bases, no estudo de sequenciamento em larga escala realizado por Tarpey *et al.* (2009), foram discutidas por Raymond *et al.* (2009). Por exemplo, grande parte das mutações *nonsense* não pôde ser relacionada à deficiência mental porque não segregavam com a doença na família ou estavam presentes em indivíduos da amostra controle; mostrou-se, assim, que cerca de 1% dos genes do cromossomo X podem aparentemente perder a função e não ter impacto clínico evidente, quando em hemizigose. No caso das mutações *missense*, a decisão sobre a natureza patogênica fica ainda mais difícil. Tarpey *et al.* (2009) usaram critérios rígidos para buscar o significado das 983 substituições diferentes que encontraram; além do estudo de segregação nas famílias, investigaram amostras controle com mais de 1000 indivíduos; levaram também em consideração a conservação evolutiva dos aminoácidos substituídos; o número de variantes do gene foi outro aspecto avaliado, pois, se maior do que a taxa de

evolução do gene, é indicativo de seleção positiva e, numa amostra de indivíduos com deficiência mental, incluiria também aquelas variantes causadoras da doença.

Em resumo, a estimativa de aproximadamente 10% para DM-X não só deixa de explicar o excesso de homens com DM em relação a mulheres afetadas, mas também não é explicada pelas mutações nos 107 genes do cromossomo já relacionados a DM.

A contribuição de microdeleções e microduplicações (CNV), no cromossomo X para DM-X vem sendo investigada nos últimos anos, por meio de *microarrays* dedicados ao cromossomo X. Microdeleções e microduplicações (aparentemente patogênicas maiores do que 100 kb foram identificadas no cromossomo X em cerca de 5% das famílias com herança ligada ao X, catalogadas no *EuroMRX Consortium* e a mais frequente dessas alterações foi a microduplicação que incluía o gene *MECP2* (Lugtenberg *et al.*, 2007). Essa microduplicação tinha sido antes identificada como responsável por cerca de 1% da DM-X (Van Esch *et al.*, 2005). Mais recentemente, Whibley *et al.* (2010) detectaram CNV patogênicas no cromossomo X em cerca de 10% das 251 famílias em que a DM segregava com padrão de herança sugestivo de ser ligada ao cromossomo X. Nessas famílias, nenhuma mutação de ponto fora detectada no estudo anterior do grupo, que sequenciou a região codificadora da maioria dos genes do cromossomo X (Tarpey *et al.*, 2009). Esses estudos mostram que os microrrearranjos do cromossomo X podem explicar parte da DM-X.

I.3. Inativação do cromossomo X e deficiência mental

A inativação do cromossomo X nas fêmeas de mamíferos, mecanismo de compensação da dose gênica entre machos e fêmeas, é estabelecida no início do desenvolvimento embrionário, de forma aleatória e clonal, pois, uma vez inativado, o

cromossomo X mantém-se inativo nas células descendentes. As fêmeas são, assim, mosaicos quanto ao cromossomo X inativo, que pode ser o materno ou o paterno em cada uma de suas células, com igual probabilidade. Conseqüentemente, as fêmeas se distribuem de acordo com uma curva normal quanto à porcentagem de células com o cromossomo X materno ou paterno inativo, como demonstrado por Amos-Landgraf *et al.* (2006), em estudo de 415 mulheres adultas da população geral. Esses autores verificaram que apenas 1,7% das mulheres apresentavam padrões de inativação com desvios extremos (>95:5); concluíram que uma mulher qualquer da população, com tal padrão de inativação, tem probabilidades pelo menos iguais de ser portadora ou não de mutação no cromossomo X que afeta a razão de inativação, justificando-se a investigação de patologias de herança ligada ao X em sua família.

As mutações no cromossomo X que causam deficiência mental aparecem frequentemente associadas a desvio de inativação do cromossomo X nas mulheres portadoras. Plenge *et al.* (2002) observaram que essas mutações estão preferencialmente no cromossomo X inativo de portadoras em 20 tipos distintos de DM-X, sugerindo que o desvio de inativação é devido à seleção contra aquelas células cujas mutações estão no cromossomo X ativo. Cerca de 50% das portadoras tinham desvios de inativação na proporção >80:20 e um terço delas apresentavam desvios na proporção >90:10, comparado com desvios >80:20 em apenas 9% das 205 mulheres do grupo controle. Os autores concluíram que o desvio de inativação extremo em mães de meninos com deficiência mental é característica comum de mutações em genes do cromossomo X que causam deficiência mental, aparecendo como específico para certas mutações. Esse padrão desviado da inativação seria consequência da vantagem proliferativa das células com o alelo normal ativo.

Em estudo realizado em nosso laboratório, Coqueti (2011) determinou o padrão de inativação do cromossomo X em 100 genitoras de meninos, casos isolados de deficiência mental moderada a grave, associada a outros sinais clínicos não característicos de síndrome conhecida; todos tinham cariótipos normais e teste negativo para a síndrome do cromossomo X frágil. Onze mulheres (11%) apresentaram padrão de inativação do X com desvios extremos ($\geq 98:2$), frequência significativamente maior do que aquela observada por Amos-Landgraf *et al.* (2006) em mulheres adultas da população geral. A raridade de desvios tão extremos na população levou à conclusão de que as mães dos afetados que apresentavam tais desvios eram portadoras de mutação no cromossomo X, que causava a deficiência mental em seus filhos. Foi, assim, estimada em 11% a frequência de deficiência mental entre meninos casos isolados de deficiência mental (IC 95% = 0,056 - 0,188), sem incluir a síndrome do X frágil, responsável por 2,5% a 3% da deficiência mental no sexo masculino. Essa estimativa para a proporção de DM-X entre indivíduos do sexo masculino, que constituem casos isolados de DM, é da mesma ordem de grandeza das estimativas baseadas (a) na frequência da síndrome do X frágil em coortes de homens com deficiência mental e entre famílias com deficiência mental de herança ligada ao X ou (b) nas inferências da prevalência de deficiência mental e de deficiência mental causada por mutações no cromossomo X, na população geral masculina (revisão em Ropers e Hamel, 2005). Entretanto, a frequência estimada para os casos isolados por Coqueti (2011) deve ser uma subestimativa, considerando que os desvios extremos do padrão de inativação ocorrem em apenas um terço das portadoras obrigatórias de mutações que causam DM-X (Plenge *et al.*, 2002). Com base nos resultados desse estudo, foi indicada a avaliação do padrão de inativação do cromossomo X em mães de indivíduos do sexo masculino, casos isolados de

deficiência mental, considerando a detecção de desvio extremo da inativação indicativa de DM-X.

Para investigar se os desvios extremos no padrão de inativação nas portadoras de mutação do cromossomo X decorrem de efeito primário no padrão de inativação ou são secundários à seleção durante o desenvolvimento, Muers *et al.* (2007) estudaram a expressão do gene *Atrx*, no desenvolvimento de camundongos. Mutações no gene humano *ATR*X causam DM-X e as mulheres portadoras dessas mutações apresentam desvio extremo no padrão de inativação do cromossomo X. O padrão de inativação foi determinado em fêmeas de camundongos heterozigotas quanto a mutação no gene *Atrx* e fêmeas sem a mutação, avaliando a presença ou não da proteína, por imunohistoquímica. Nos embriões com oito dias de idade, não houve diferença entre o número de células *Atrx*-negativas e positivas, o que permitiu a conclusão de que, a inativação do cromossomo X é casual no momento em que é estabelecida. A análise de diferentes tecidos durante o desenvolvimento mostrou declínio de células que não expressavam a proteína, uma indicação de que o desvio da inativação do X observado em tecidos das fêmeas adultas resulta da seleção celular, durante a formação dos tecidos.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve o objetivo de identificar genes candidatos a deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X. Estudamos quatro famílias, em que a deficiência mental segregava num padrão típico de herança ligada ao X e 24 irmandades com pelo menos dois indivíduos do sexo masculino apresentando deficiência mental. A síndrome do cromossomo X frágil e alterações cromossômicas detectáveis na análise após bandamento G foram afastadas como causa da deficiência mental. Iniciamos o estudo determinando o padrão de inativação do cromossomo X nas mães dos afetados, uma vez que padrões de inativação do cromossomo X extremamente desviados são frequentes em portadoras de mutações no cromossomo X, que causam deficiência mental em homens. Em seguida, buscamos desequilíbrios submicroscópicos do cromossomo X, por meio de hibridação genômica comparativa baseada em array (a-CGH), nos probandos dos casos familiares e das irmandades com dois ou mais afetados cujas mães apresentaram desvios extremos de inativação do cromossomo X. Nos casos familiares, delimitamos região candidata a conter o gene alterado, genotipando marcadores moleculares do tipo microssatélites e excluindo os segmentos que não segregavam com a deficiência mental; alguns genes que já haviam sido associados a deficiência mental e que estavam localizados nos segmentos delimitados foram sequenciados; os exomas de três propósitos foram sequenciados.

Na **Família 1** os afetados, em duas gerações, apresentavam deficiência mental grave-profunda associada a microcefalia, baixa estatura, fâcies peculiar e puberdade precoce. As portadoras obrigatórias apresentaram desvio total de inativação do cromossomo X. Em estudo anterior, tinha sido detectada, nessa família, uma microdeleção no cromossomo X que, inicialmente considerada como causal, pôde ser

descartada pela sua ocorrência populacional. Utilizando marcadores do tipo microssatélites, delimitamos uma região candidata de aproximadamente 29 Mb entre DXS1068 (Xp11.4 - 38,908,227-38,908,332) e DXS1216 (Xq13.1 - 68,264,353-68,464,720). Dentre os 26 genes já relacionados a deficiência mental contidos nesse segmento, sequenciamos 12 e não encontramos alteração: *ZNF81* (*zinc finger protein 81*), *PQBP1* (*polyglutamine binding protein 1*), *ATP6AP2* (*ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2*), *OTC* (*ornithine carbamoyltransferase*), *MAOA* (*monoamine oxidase A*), *KDM5C* (*lysine (K)-specific demethylase 5C*), *FGD1* (*FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1*), *HSD17B10* (*hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10*), *SYN1* (*synapsin I*), *SHROOM4* (*shroom family member 4*), *TSPAN7* (*tetraspanin 7*) e *OPHN1* (*oligophrenin 1*). Posteriormente, o sequenciamento do exoma do probando revelou duas mutações *missense*, com alta chance de serem patogênicas, nos genes *TIMP1* (*TIMP metalloproteinase inhibitor 1*) e *HUWE1* (*HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase*), mapeados no segmento que segregava com a doença na família. As patologias já associadas com níveis alterados da proteína TIMP1 tornaram pouco provável que a mutação tivesse associação causal com a deficiência mental na família. O gene *HUWE1*, por sua vez, codifica um membro da família de ligases de ubiquitina HECT E3 e já foi associado a deficiência mental. A mutação c.12378C>G resulta na substituição do aminoácido cisteína por triptofano (C4126W), no domínio HECT, em posição evolutivamente conservada e segrega com a deficiência mental na família. Muito provavelmente essa mutação é a causa da deficiência mental na **Família 1**.

Os afetados da **Família 2**, dois primos em primeiro grau e um tio materno, apresentavam deficiência mental aparentemente moderada associada a distúrbios. Suas mães apresentaram desvio completo da inativação do cromossomo X. No

propósito, não foram detectadas microdeleções ou microduplicações do cromossomo X. A genotipagem de marcadores do tipo microssatélites permitiu delimitar uma região de aproximadamente 70 Mb entre os marcadores DXS993 (41,147,683-41,147,988) e DXS1059 (111,325,975-111,326,164), como candidata a conter a mutação causadora da deficiência mental. Nesse segmento estão mapeados 44 genes já associados a deficiência mental. Sequenciamos inicialmente os genes *PQBP1*, *HSD17B10*, *KDM5C*, *SYN1* e *OPHN1* e não encontramos alteração. O sequenciamento do exoma do propósito revelou, no segmento candidato, mutações *missense*, com alta probabilidade de serem patogênicas, nos genes *TAF1* (*TAF1 RNA polymerase II, tata box-binding protein-associated factor*) e *SHROOM4* (*shroom family member 4*). A mutação c.4406A>T no gene *TAF1* leva à substituição do aminoácido histidina por leucina (H1469L), numa sequência extremamente conservada entre os mamíferos. Entretanto, a única doença já associada a mutação no gene *TAF1* é a distonia de torção-parkinsonismo, de manifestação tardia, com o aparecimento dos primeiros sinais na terceira década de vida, o que torna pouco provável que a mutação nesse gene seja responsável pela deficiência mental na família. A mutação *missense* c.1413C>A no gene *SHROOM4* resulta na substituição do aminoácido prolina por treonina (P463T). A prolina substituída é altamente conservada entre os mamíferos. Alterações no gene *SHROOM4* (mutação familiar *missense* e quebra do gene em dois casos de translocação X;autossomo) já foram relacionadas anteriormente a deficiência mental. A mutação que detectamos, que segrega com a deficiência mental, aparece, assim, como causa mais provável da deficiência mental na **Família 2**.

Na **Família 3**, dois irmãos e um primo materno em primeiro grau apresentavam deficiência mental grave associada a dismorfismos; um dos meninos tinha tetralogia de Fallot. As mães dos afetados apresentaram desvio total de inativação do cromossomo X.

No propósito não foram detectadas microduplicações ou microdeleções no cromossomo X. Usando marcadores do tipo microssatélite, foi possível delimitar uma região candidata para conter a mutação responsável pela deficiência mental, de aproximadamente 40 Mb, entre os marcadores DXS8080 (44,243,430-44,243,620) e DXS1196 (86,688,618-86,688,830). Nesse segmento estão mapeados 32 genes já associados a deficiência mental. Dentre esses, sequenciamos os genes *SYN1*, *PQBP1*, *SHROOM4*, *KDM5C*, *HSD17B10*, *FGDI* e *OPHN1* e não encontramos alteração patogênica. A análise do exoma do propósito revelou, no segmento candidato, uma mutação *missense* com alta probabilidade de ser patogênica no gene *KIAA2022*. A mutação - c.262G>A resulta na substituição do ácido glutâmico, altamente conservado em mamíferos, por lisina (E88K) e segrega com a deficiência mental na família. O gene *KIAA2022* já foi relacionado a deficiência mental, tendo sido rompido por uma das quebras de uma inversão pericêntrica do cromossomo X em afetados de uma família. É provável, assim, que a mutação que detectamos no gene *KIAA2022* seja responsável pela deficiência mental na **Família 3**.

Na **Família 4**, o propósito, seu irmão, três primos em primeiro grau e um primo em segundo grau apresentavam deficiência mental associada a microcefalia. No propósito e em seu irmão foi documentada malformação de Dandy-Walker. As mães dos afetados apresentaram desvios significativos da inativação do cromossomo X (80:20 e 90:10). Uma duplicação de segmento de aproximadamente 300 kb em Xq28 (ChrX:153,578,110-153,880,794 - Hg19) foi detectada nos afetados e em suas mães. Esse segmento contém 18 genes, dos quais dois, *FLNA* (*filamin A, alpha*) e *GDII* (*GDP dissociation inhibitor 1*) já foram associados a deficiência mental, *RPL10* (*ribosomal protein L10*) foi associado a autismo e *ATP6AP1* (*ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1*) é altamente expresso no cérebro. Ganhos de cópias de segmentos

semelhantes foram descritos anteriormente associados a deficiência mental em três famílias e em um caso isolado, alguns afetados apresentando malformação de Dandy-Walker, indicando ser esta a causa da deficiência mental na **Família 4**.

No estudo das 24 irmandades com pelo menos dois indivíduos do sexo masculino com deficiência mental, determinamos o padrão de inativação do cromossomo X nas mães dos afetados. Quatro mulheres (16,7%) apresentaram desvios extremos de inativação do cromossomo X (padrão 100:0), frequência significativamente maior do que aquela registrada na literatura para desvios de inativação $\geq 95\%$ em mulheres da população geral (aproximadamente 2%). Considerando ainda que cerca de 30% das portadoras de mutações que causam deficiência mental de herança ligada ao X têm desvios significativos de inativação, admitimos que as mães de pelo menos dois afetados, apresentando tais desvios eram provavelmente portadoras de mutações responsáveis pela deficiência mental em seus filhos. Investigamos a presença de microduplicações e microdeleções do cromossomo X nos probandos dessas quatro irmandades e não encontramos alterações.

ABSTRACT

VI. ABSTRACT

This study aimed at identifying candidate genes for X-linked intellectual disability (ID). Four families in which ID of unknown cause segregated as an X-linked trait, and 24 sibships with at least two affected males were investigated. The pattern of X-inactivation was determined in the mothers of affected males, taking into account that extremely skewing of X-inactivation is frequently found in women carrying mutations causative of X-linked intellectual disability (XLID). In the XLID families, ID was mapped by the genotyping of microsatellite markers localized throughout the X chromosome. Cryptic X-chromosome imbalances were investigated by array-based comparative genomic hybridization (a-CGH). Positional candidate genes that had been associated with ID were directly sequenced in the search for causative mutations. In three XLID families, the proband had their exome sequenced.

In three XLID families missense mutations that led to substitutions of conservative amino acid residues were found that segregated with ID, and were probably causative of the clinical phenotypes: c.12378C>G in *HUWE1* (*HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase*) gene; c.1413C>A in the *SHROOM4* (*shroom family member 4*) gene; c.262G>A in the *KIAA2022* gene. Heterozygotes for these mutations had completely skewed X-inactivation (100:0 inactivation ratio). Point mutations or disruption of these genes by rearrangement breakpoints have been previously described in a few patients with ID.

In one family in which XLID was associated with microcephaly and Dandy-Walker malformation, a duplication of approximately 300 kb at Xq28 (ChrX:153,578,110-153,880,794 - Hg19) was found segregating with the disease. Heterozygotes for this duplication had skewed X-inactivation (80:20 and 90:10

inactivation ratios). Similar duplications have been described in three European families and one sporadic case, Dandy-Walker malformation being documented in some patients.

In the study of the 24 sibships with at least two males presenting with ID, the maternal pattern of X-inactivation was determined. Four women (16.7%) showed completely skewing of X-inactivation (100:0 inactivation ratio), a frequency significantly higher than the reported frequency of skewing $\geq 95\%$ in women from the general population (about 2%). Considering this finding and that extremely skewed X-inactivation have been reported in about 30% of carriers of mutations causing XLID, it was assumed that the four mothers of males presenting with ID were most probably carriers of the mutations causative of ID in their sons. Chromosome X microimbalances were not found in the proband, in these four sibships.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de identificar genes candidatos para deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X (DMLX). Foram investigadas quatro famílias, nas quais a deficiência mental de causa desconhecida segregava num padrão típico de herança ligada ao X, e 24 irmandades que incluíam pelo menos dois afetados do sexo masculino. O padrão de inativação do cromossomo X foi determinado nas mães dos afetados, pois desvios extremos no padrão de inativação são frequentes em mulheres portadoras de mutações no cromossomo X que causam DMLX. Nas famílias com padrão de herança ligada ao X, a deficiência mental foi mapeada, usando marcadores moleculares do tipo microssatélite, localizados ao longo do cromossomo X. Desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos foram investigados por hibridação genômica comparativa baseada em *array (array)-CGH*. Genes candidatos posicionais que já haviam sido associados a deficiência mental foram sequenciados pelo método de Sanger, em busca de mutações patogênicas. Em três famílias com DMLX, o probando teve seu exoma sequenciado. Nas três famílias com DMLX em que o sequenciamento do exoma foi realizado, foram detectadas mutações *missense*, levando à substituição de resíduos de aminoácidos conservados, que segregavam com a deficiência mental. Essas mutações foram consideradas como prováveis causas dos fenótipos nessas famílias: c.12378C>G no gene *HUWE1 (HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase)*; c.1413C>A no gene *SHROOM4 (shroom family member 4)* e c.262G>A no gene *KIAA2022*. As mulheres heterozigóticas quanto a essas mutações apresentaram desvio completo de inativação do cromossomo X (100:0). Mutações de ponto ou interrupção desses genes por rearranjos cromossômicos foram previamente descritas em alguns pacientes com deficiência mental. Em uma família, em que a DMLX estava associada a microcefalia e malformação de Dandy-Walker, uma microduplicação de aproximadamente 300 kb em Xq28 (ChrX :153,578,110-153,880,794;Hg19) foi detectada segregando com a doença. As mulheres heterozigóticas quanto a essa duplicação apresentaram desvios de inativação do X (80:20 e 90:10). Duplicações semelhantes foram anteriormente descritas em três famílias europeias e em um caso esporádico; a malformação de Dandy-Walker foi documentada em alguns desses pacientes. No estudo das 24 irmandades com pelo menos dois indivíduos do sexo masculino apresentando deficiência mental, o padrão de inativação do cromossomo X de suas mães foi

determinado. Quatro mulheres (16,7%) apresentaram desvio total de inativação do cromossomo X (100:0), frequência significativamente maior do que a descrita para população geral de mulheres adultas (cerca de 2 %). Considerando que desvios extremos de inativação do cromossomo X são observados em aproximadamente 30% das portadoras de mutações que causam DMLX, concluiu-se que as quatro mães de homens que apresentam deficiência mental eram provavelmente portadoras de mutações no cromossomo X, causadoras da deficiência mental em seus filhos. Não foram encontradas microdeleções ou microduplicações no cromossomo X nos probandos das quatro irmandades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW - Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** **51**: 1229-39, 1992.
- American Psychiatric Association - Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV (American Psychiatric Association), Washington, D.C., 1994.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF - X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. **Am J Hum Genet** **79**:493-99, 2006.
- Anderson CL, Brown CJ - Variability of X chromosome inactivation: effect of levels of *TIMPI* RNA and role of DNA methylation. **Hum Genet** **110**:271-78, 2002.
- Biancalana V, Beldjord C, Taillandier A, Szpiro-Tapia S, Cusin V, Gerson F, Philippe C, Mandel JL - Five years of molecular diagnosis of Fragile X syndrome (1997-2001): a collaborative study reporting 95% of the activity in France. **Am J Med Genet** **129A**:218-24, 2004.
- Bienvendu T, des Portes V, Saint Martin A, McDonnell N, Billuart P, Carrié A, Vinet MC, Couvert P, Toniolo D, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Kahn A, Beldjord C, Chelly J - Non-specific X-linked semidominant mental retardation by mutations in a Rab GDP-dissociation inhibitor. **Hum Mol Genet** **7**:1311-15, 1998.
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeveva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG - Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. **J Med Genet** **45**:309-13, 2008.
- Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R - The proteasome. **Ann Rev Biophys Biomol Struct** **28**:295-317, 1999.
- Cantagrel V, Lossi A-M, Boulanger S, Depetris D, Mattei M-G, Gecz J, Schwartz CE, Van Maldergem L, Villard L - Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males. **J Med Genet** **41**:736-42, 2004.

- Cantagrel V, Haddad MR, Ciofi P, Andrieu D, Lossi AM, Maldergem Lv, Roux JC, Villard L - Spatiotemporal expression in mouse brain of Kiaa2022, a gene disrupted in two patients with severe mental retardation. **Gene Expr Patterns** **9**:423-29, 2009.
- Chiocchetti A, Pakalapati G, Duketis E, Wiemann S, Poustka A, Poustka F, Klauck SM - Mutation and expression analyses of the ribosomal protein gene RPL10 in an extended German sample of patients with autism spectrum disorder. **Am J Med Genet** **155A**:1472-75, 2011.
- Chiurazzi P, Oostra BA - Genetics of mental retardation. **Curr Opin Pediatr** **12**:529-35, 2000.
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW - Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. **Science** **296**:1254-58, 2002.
- Coqueti KN - O cromossomo X e a deficiência mental no sexo masculino. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, USP, 2011. 56pp.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL - *FMRI* and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genet Med** **3**:359-71, 2001.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J, Toniolo D - Mutations in *GDI1* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. **Nat Genet** **19**:134-39, 1998.
- de Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BB, van Bokhoven H, Van Esch H, Frints SG, Froyen G, Fryns JP, Raynaud M, Moizard MP, Ronce N, Bensalem A, Moraine C, Poirier K, Castelnau L, Saillour Y, Bienvenu T, Beldjord C, des Portes V, Chelly J, Turner G, Fullston T, Gecz J, Kuss AW, Tzschach A, Jensen LR, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH, Hamel BC - Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. **Hum Mutat** **28**:207-08, 2007.
- DerMardirossian C, Bokoch GM - GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. **Trends Cell Biol** **15**:356-63, 2005.

- des Portes V, Soufir N, Carrié A, Billuart P, Bienvenu T, Vinet MC, Beldjord C, Ponsot G, Kahn A, Boué J, Chelly J - Gene for nonspecific X-linked mental retardation (MRX 47) is located in Xq22.3-q24. **Am J Med Genet** **72**:324-28, 1997.
- Devriendt K, Vermeesch JR - Chromosomal phenotypes and submicroscopic abnormalities. **Hum Genomics** **2**:126-33, 2004.
- Dover J, Schneider J, Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A - Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by RAD6. **J Biol Chem** **277**:28368-71, 2002.
- Fishburn J, Turner G, Daniel A, Brookwell R - The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. **Am J Med Genet** **4**:713-24, 1983.
- Froyen, G - Response to Fusco *et al.* (Letter) **Am J Hum Genet** **86**:652-53, 2010.
- Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, Sanlaville D, van Bokhoven H, Ropers HH, Laumonnier F, Ranieri E, Schwartz CE, Abidi F, Tarpey PS, Futreal PA, Whibley A, Raymond FL, Stratton MR, Fryns JP, Scott R, Peippo M, Sipponen M, Partington M, Mowat D, Field M, Hackett A, Marynen P, Turner G, Gécz J - Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. **Am J Hum Genet** **82**:432-43, 2008.
- Froyen G, Belet S, Martinez F, Santos-Rebouças CB, Declercq M, Verbeeck J, Donckers L, Berland S, Mayo S, Rosello M, Pimentel MM, Fintelman-Rodrigues N, Hovland R, Rodrigues dos Santos S, Raymond FL, Bose T, Corbett MA, Sheffield L, van Ravenswaaij-Arts CM, Dijkhuizen T, Coutton C, Satre V, Siu V, Marynen P. Copy-number gains of HUWE1 due to replication- and recombination-based rearrangements. **Am J Hum Genet** **91**:252-64, 2012.
- Fusco F, D'Urso M, Miano MG, Ursini MV - The LCR at the IKBKG locus is prone to recombine. (Letter) **Am J Hum Genet** **86**:650-52, 2010.

- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC, Kidd JM, Browning SR, Browning BL, Dickel DE, Levy DL, Ballif BC, Platky K, Farber DM, Gowans GC, Wetherbee JJ, Asamoah A, Weaver DD, Mark PR, Dickerson J, Garg BP, Ellingwood SA, Smith R, Banks VC, Smith W, McDonald MT, Hoo JJ, French BN, Hudson C, Johnson JP, Ozmore JR, Moeschler JB, Surti U, Escobar LF, El-Khechen D, Gorski JL, Kussmann J, Salbert B, Lacassie Y, Biser A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Deardorff MA, Shaikh TH, Haan E, Friend KL, Fichera M, Romano C, Gécz J, DeLisi LE, Sebat J, King MC, Shaffer LG, Eichler EE - A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. **Nat Genet** **42**:203-10, 2010.
- Graves JA, Gecz J, Hameister H - Evolution of the human X - a smart and sexy chromosome that controls speciation and development. **Cytogenet Genome Res** **99**:141-45, 2002.
- Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD - A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Hum Genet** **97**:808-12, 1996.
- Hagens O, Dubos A, Abidi F, Barbi G, Van Zutven L, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, van Bokhoven H, Gécz J, Dollfus H, Ropers HH, Schwartz CE, Stocco dos Santos RC, Kalscheuer V, Hanauer A - Disruptions of the novel KIAA1202 gene are associated with X-linked mental retardation. **Hum Genet** **118**:578-90, 2006.
- Hamel BC, Kremer H, Wesby-van Swaay E, van den Helm B, Smits AP, Oostra BA, Ropers HH, Mariman EC - A gene for nonspecific X-linked mental retardation (MRX41) is located in the distal segment of Xq28. **Am J Med Genet** **64**:131-33, 1996.
- Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J - Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. **J Hum Genet** **55**:590-99, 2010.

- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM - A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proc Natl Acad Sci USA** **92**:5249, 1995.
- Inlow JK, Restifo, LL - Molecular and comparative genetics of mental retardation. **Genetics** **166**:835-81, 2004.
- Jobanputra V, Levy B, Kinney A, Brown S, Shirazi M, Yu C, Kline J, Warburton D - Copy number changes on the X chromosome in women with and without highly skewed X-chromosome inactivation. **Cytogenet Genome Res** **136**:264-69, 2012.
- Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gécz J, Sefiani A, Hoffmann K, Moser B, Haas S, Gurok U, Haesler S, Aranda B, Nshedjan A, Tzschach A, Hartmann N, Roloff TC, Shoichet S, Hagens O, Tao J, Van Bokhoven H, Turner G, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Nuber U, Hoeltzenbein M, Scharff C, Scherthan H, Lenzner S, Hamel BC, Schweiger S, Ropers HH - Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. **Nat Genet** **35**:313-15, 2003.
- Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Tran A, Carballo M, Saghizadeh M, Vasiliou V, Adachi W, Brown DJ - Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays an role in this disorder. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **46**:823-32, 2005.
- Kim HC, Huibregtse JM - Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. **Mol Cell Biol** **29**:3307-18, 2009.
- Klauck SM, Felder B, Kolb-Kokocinski A, Schuster C, Chiocchetti A, Schupp I, Wellenreuther R, Schmötzer G, Poustka F, Breitenbach-Koller L, Poustka A - Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. **Mol Psychiatry** **11**:1073-84, 2006.
- Lehrke R - A theory of X-linkage of major intellectual traits. **Am J Mental Deficiency** **78**:611-19, 1972.
- Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE - Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. **Am J Hum Genet** **90**:579-90, 2012.

- Lugtenberg D, Veltman JA, van Bokhoven H - High-resolution genomic microarrays for X-linked mental retardation. **Genet Med** 9:560-65, 2007.
- Lugtenberg D, Zangrande-Vieira L, Kirchhoff M, Whibley AC, Oudakker AR, Kjaergaard S, Vianna-Morgante AM, Kleefstra T, Ruiten M, Jehee FS, Ullmann R, Schwartz CE, Stratton M, Raymond FL, Veltman JA, Vrijenhoek T, Pfundt R, Schuurs-Hoeijmakers JHM, Hehir-Kwa JY, Froyen G, Chelly J, Ropers HH, Moraine C, Gècz J, Knijnenburg J, Kant SG, Hamel BCJ, Rosenberg C, van Bokhoven H, de Brouwer AP - Recurrent deletion of *ZNF630* at Xp11.23 is not associated with mental retardation. **Am J Med Genet A** 152:638-45, 2010.
- Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, Matsumoto S, Tabuena MD, Maranon E, Dantes M, Lee LV, Ogasawara K, Tooyama I, Akatsu H, Nishimura M, Tamiya G - Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. **Am J Hum Genet** 80: 393-406, 2007.
- Mandel JL, Chelly J - Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. **Eur J Hum Genet** 12:689-93, 2004.
- Muers MR, Sharpe JA, Garrick D, Sloane-Stanley J, Nolan PM, Hacker T, Wood WG, Higgs DR, Gibbons RJ - Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. **Am J Hum Genet** 80: 1138-49, 2007.
- Nascimento RMP, Otto PA, de Brouwer APM, Vianna-Morgante AM - UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet** 79:549-55, 2006.
- Nguyen DK, Distèche CM - High expression of the mammalian X chromosome in brain. **Brain Res** 1126:46-49, 2006.
- Penrose LS - A clinical and genetic study 1280 cases of mental retardation defect. **Special Report Series, Medical Research Council**, n° 229. Her Majesty's Stationary office, London, 1938.

- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF – Skewed X-Chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. **Am J Hum Genet** **71**:168-73, 2002.
- Raymond FL, Whibley A, Stratton MR, Gecz J - Lessons learnt from large-scale exon re-sequencing of the X chromosome. **Hum Mol Genet** **18**:60-64, 2009.
- Ropers HH, Hamel BC - X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** **6**:46-57, 2005.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ - Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **J Med Genet** **43**:180-6, 2006.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM - The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell** **75**:495-505, 1993.
- Stocco dos Santos RC, Barretto OCO, Nonoyama K, Castro NHC, Ferraz OP, Walter-Moura J, Vescio CCS, Becak W - X-linked syndrome: mental retardation, hip luxation, and G6PD variant (Gd(+)) Butantan). **Am J Med Genet** **39**:133-36, 1991.
- Stocco dos Santos RC, Castro NH, Lillia Holmes A, Beçak W, Tackels-Horne D, Lindsey CJ, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE - Stocco dos Santos X-linked mental retardation syndrome: clinical elucidation and localization to Xp11.3-Xq21.3. **Am J Med Genet A** **118**:255-59, 2003.
- Strom CM, Crossley B, Redman JB, Buller A, Quan F, Peng M, McGinnis M, Fenwick RG Jr, Sun W - Molecular testing for Fragile X Syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory. **Genet Med** **9**:46-51, 2007.

Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** **41**:535-43, 2009.

Toniolo D - In search of the MRX genes. **Am J Med Genet** **97**:221-27, 2000.

Turner F, Gedeon A, Mulley J - X-linked mental retardation with heterozygous expression and macrocephaly: pericentromeric gene localization. **Am J Med Genet** **51**:575-80, 1994.

Turner G, Partington MW - Genes for intelligence on the X chromosome. **J Med Genet** **28**:429, 1991.

Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G - Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. **Am J Hum Genet** **77**:442-53, 2005.

Vandewalle J, Van Esch H, Govaerts K, Verbeeck J, Zweir C, Madrigal I, Mila M, Pijkels E, Fernandez I, Kohlase J, Spaich C, Rauch A, Fryns JP, Marynen P, Froyen G - Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. **Am J Hum Genet** **85**:809-22, 2009.

Vicoso B, Charlesworth B - Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. **Nat Rev Genet** **7**:645-53, 2006.

- Wassarman DA, Sauer F - TAF(II)250: a transcription toolbox. **J Cell Sci** **114**:2895-902, 2001.
- Weissman AM - Themes and variations on ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol** **2**:169-78, 2001.
- Whibley AC, Plagnol V, Tarpey PS, Abidi F, Fullston T, Choma MK, Boucher CA, Shepherd L, Willatt L, Parkin G, Smith R, Futreal PA, Shaw M, Boyle J, Licata A, Skinner C, Stevenson RE, Turner G, Field M, Hackett A, Schwartz CE, Gecz J, Stratton MR, Raymond FL - Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. **Am J Hum Genet** **87**:173-88, 2010.
- World Health Organization. The ICD-10 classification of neonatal and behavioral disorders - World Health Organization, Geneva, 1992.
- Yoder M, Hildebrand JD - Shroom4 (Kiaa1202) is an actin-associated protein implicated in cytoskeletal organization. **Cell Motil Cytoskeleton** **64**:49-63, 2007.
- Zechner U, Wilda M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Fundele R, Hameister H - A high density of X-linked genes for general cognitive ability; a run-away process shaping human evolution? **Trends Genet** **17**: 697-701, 2001.

Fontes da Internet:

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Genatlas - <http://http://www.genatlas.org/>

GCC - Greenwood Genetic Center - <http://www.ggc.org/xlmr.htm>

NCBI - National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nih.gov/>

PRIMER3 - <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/>

UCSC Genome Bioinformatics: <http://genome.ucsc.edu>.

Marshfield Center for Medical Genetics: http://research.marshfieldclinic.org/genetics/Map_Markers/maps/IndexMapFrames.htm.