

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

ALICE SANTOS DA SILVA

INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DE DEFICIÊNCIA INTELECTUAL RECORRENTE EM
FAMÍLIA DO SERTÃO DE ALAGOAS

MACEIÓ-AL

2025

ALICE SANTOS DA SILVA

INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DE DEFICIÊNCIA INTELECTUAL RECORRENTE EM
FAMÍLIA DO SERTÃO DE ALAGOAS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao corpo docente do
Instituto de Ciências Biológicas e da
Saúde como requisito parcial a fim
de receber o título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Thalita
Cristina Figueiredo Cunha.

MACEIÓ-AL

2025

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Cláudio Albuquerque Reis – CRB-4 – 1753

- | | |
|-------|--|
| S586i | <p>Silva, Alice Santos da.
Investigação genética de deficiência intelectual recorrente em família do sertão de Alagoas / Alice Santos da Silva. – 2025.
48 f. : il.</p> <p>Orientadora: Thalita Cristina Figueiredo Cunha</p> <p>Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2025.</p> <p>Bibliografia. f. 45-48.</p> <p>1. Ciências biológicas. 2. Pessoas com deficiência intelectual. 3. Incapacidade intelectual. 4. Cromossomo X – Anomalias. 5. Genealogia. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575.17(813.5)</p> |
|-------|--|

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALICE SANTOS DA SILVA

INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DE DEFICIÊNCIA INTELECTUAL RECORRENTE EM FAMÍLIA DO SERTÃO DE ALAGOAS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao corpo docente do
Instituto de Ciências Biológicas e da
Saúde como requisito parcial a fim
de receber o título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Thalita
Cristina Figueiredo Cunha.

Documento assinado digitalmente
 **THALITA CRISTINA FIGUEIREDO CUNHA**
Data: 22/05/2025 10:36:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof^a Dr^a Thalita Cristina Figueiredo Cunha (FAMED-UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINNE DE SALES MARQUES**
Data: 26/05/2025 14:27:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora: Prof. Dr^a Carolinne de Sales Marques (ICBS-UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **DALMO ALMEIDA DE AZEVEDO**
Data: 26/05/2025 19:55:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador: Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo (ICBS-UFAL)

Aos meus pais, Jeane Santos e José Ailton, que sempre me apoiaram em minhas decisões e no foco em meus estudos desde a minha infância; e por proporcionarem tudo o que eu precisava para me auxiliar nessa jornada árdua.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me conduziu e me fortificou nesse caminho árduo, ajudando-me a enfrentar minhas inseguranças e medos.

À minha família, por todo o apoio e pelas palavras de incentivo em minha caminhada. Por me ouvirem e por acreditarem em mim e nos meus sonhos. Aos meus pais, Jeane e Ailton, pelo investimento e pela dedicação que tiveram em minha formação, permitindo que eu e meu irmão tivéssemos o melhor nesta vida. Agradeço também pelo constante apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado, Pedro, meu pilar essencial, que sempre me reergueu nos momentos em que eu duvidava de mim mesma ou achava que não conseguiria seguir em frente. Sua presença foi um constante apoio, cheia de amor e incentivo, guiando-me não apenas na minha formação, mas em cada passo da minha jornada.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Thalita Figueiredo, cuja orientação foi fundamental em minha trajetória acadêmica. Com paciência, sabedoria e dedicação, você não apenas me lapidou como pesquisadora, mas me guiou com maestria pelo desafiador mundo da ciência. Sua mentoria foi essencial para que eu aprendesse a superar minhas inseguranças, transformando cada dúvida em oportunidade de crescimento. Por acreditar no meu potencial mesmo quando eu mesma duvidava, por me incentivar a ir além dos meus limites e por me mostrar o verdadeiro significado da resiliência científica. Suas lições são ensinamentos que levarei para toda a minha vida profissional e pessoal.

À minha querida amiga e companheira de laboratório, Mirele, cuja amizade e parceria foram faróis em minha trajetória laboratorial. Nos momentos mais desafiadores da pesquisa, você esteve ao meu lado não apenas como colega, mas como verdadeira irmã de ciência, transformando pressão em leveza e dificuldades em oportunidades de crescimento. Sua presença iluminou meus dias no laboratório, lembrando-me sempre que por trás de cada protocolo rígido havia espaço para alegria, descobertas compartilhadas e risadas sinceras.

Às minhas queridas amigas Nicolle, Andrielly, Laila, Isabelly e Julia, que sempre estiveram ao meu lado, celebrando cada uma de minhas conquistas, me incentivando a seguir em frente e compartilhando momentos únicos e felizes comigo. Em especial, à você, Nicolle,

companheira de tantos anos, que esteve presente em todos os momentos, nas alegrias e nas tristezas, sempre me ouvindo atentamente e vibrando genuinamente com cada vitória minha. Não existem palavras que possam expressar o quanto sua amizade foi e continua sendo fundamental em minha vida.

Aos meus queridos amigos Mota, Samuel, Emilio, Antônio, Davi, Enzo, Higor, Jon, Jhon, Pedro Leão, por cada risada compartilhada e momento de descontração com o humor peculiar (e às vezes preocupante) de vocês, que tornaram os dias mais leves. Vocês foram essenciais não apenas na diversão, mas no apoio sincero em todos os momentos. Obrigado por estarem presentes, pela paciência e pela amizade que sempre me motivou a seguir em frente.

A todos que compartilharam comigo esta jornada acadêmica, desde o ensino fundamental até aqui, deixando marcas memoráveis e apoio nos momentos desafiadores.

Aos membros do Laboratório de Genética Molecular Humana do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA/UFAL): Ana Karolina, Reginaldo Petroli, Débora Michelatto, Marshal Fontes, Chrystenise Paes, Virgílio e Kris, pelo compartilhamento de conhecimentos essenciais e pelos momentos de descontração que tornaram a jornada acadêmica mais leve e enriquecedora.

Aos participantes desta pesquisa, cuja valiosa contribuição e cooperação foram essenciais para o avanço do conhecimento científico

Aos docentes do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL, cujo conhecimento, dedicação e inspiração foram fundamentais para minha formação acadêmica. Em especial, aos professores Francisco Tovar, Dalmo e Carolinne, que não apenas me guiaram academicamente, mas também despertaram em mim uma paixão ainda maior pela Genética, inspirando-me com seus conhecimentos e dedicação.

E por fim, às agências de fomento à pesquisa brasileiras FAPEAL, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro essencial ao desenvolvimento desta e de tantas outras pesquisas que contribuem para o avanço científico nacional.

Nada é impossível se você estiver disposto a trabalhar duro e acreditar em si mesmo.

(One Piece)

RESUMO

A deficiência intelectual é uma condição caracterizada por alterações comportamentais e cognitivas, podendo ser clinicamente síndrômica ou não síndrômica. Sua prevalência global é estimada entre 1% e 3%, sendo mais frequente no sexo masculino. Devido sua alta heterogeneidade etiológica e clínica, a elucidação de suas causas pode ser um processo desafiador. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo realizar a investigação molecular da causa da deficiência intelectual recorrente em homens de uma família oriunda da cidade de Piranhas, sertão de Alagoas. O núcleo familiar investigado consiste em um casal com oito filhos, sendo duas mulheres e seis homens, dos quais quatro apresentam deficiência intelectual grave associada a outras manifestações clínicas como: distúrbio psiquiátrico delirante e heteroagressividade, além de macrocefalia. A mãe apresenta deficiência intelectual moderada. Para investigação molecular, foram coletadas amostras biológicas de cinco integrantes da família (pai, mãe, filha e dois filhos com a clínica em questão). Inicialmente, a partir da história familiar e quadro clínico, foi realizada a investigação do gene *FMRI* associado à síndrome do X-frágil, principal causa monogênica de deficiência intelectual, com herança dominante ligada ao X. Após o resultado negativo, foi feito o sequenciamento do exoma completo de um dos indivíduos com fenótipo clínico, seguido da análise de co-segregação familiar por sequenciamento de Sanger. A partir dessa estratégia, foi identificada uma nova variante *nonsense* em hemizigose (c.262C>T; p.Arg88*) no gene *SYP* (*Synaptophysin*) (NM_003179.3), localizado em *Xp11.23*. Essa variante promove um códon de terminação prematura e a interrupção da síntese proteica. O gene *SYP* codifica a proteína sinaptofisina, composta por 313 aminoácidos, altamente conservada entre os mamíferos. É uma proteína integral de membrana, responsável pela regulação da endocitose da vesícula sináptica, atuando como a principal proteína da vesícula sináptica devido à sua abundância. Variantes patogênicas no gene *SYP* já foram associadas à deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, com associação a epilepsia. Diante disso, as características clínicas evidenciadas no presente estudo já foram relatadas na literatura em relação a alterações no gene *SYP*. Contudo, além dos sinais clínicos citados, todos os indivíduos afetados de sexo masculino avaliados apresentam macrocefalia e transtornos psiquiátricos, expandindo o espectro de fenótipo clínico associado a nova variante no gene *SYP*.

Palavras-Chave: Deficiência intelectual; Recorrência familiar; Cromossomo X; gene *SYP*.

ABSTRACT

Intellectual disability is a condition characterized by behavioral and cognitive alterations, which can be clinically syndromic or non-syndromic. Its global prevalence is estimated to be between 1% and 3%, being more frequent in males. Due to its high etiological and clinical heterogeneity, elucidating its causes is challenging. In this context, the present study aimed to conduct a molecular investigation into the cause of recurrent intellectual disability in men from a family originating from the city of Piranhas, in the hinterlands of Alagoas, Brazil. The investigated family nucleus consists of a couple with eight offspring, two women and six men, four of whom present severe intellectual disability associated with other clinical manifestations such as delusional psychiatric disorder, hetero-aggressiveness, and macrocephaly. The mother also has moderate intellectual disability. For molecular investigation, biological samples were collected from five family members (father, mother, daughter, and two sons with the condition in question). Initially, based on family history and clinical presentation, analysis focused on the *FMRI* gene, associated with Fragile X syndrome -the most common monogenic cause of intellectual disability with X-linked dominant inheritance. After a negative results for Fragile X whole-exome sequencing was performed on one individual with the clinical phenotype, followed by familial co-segregation analysis using Sanger sequencing. This approach led to the identification of a novel nonsense variant in hemizygoty (c.262C>T; p.Arg88*) in the *SYP* gene (*Synaptophysin*, NM_003179.3), located at Xp11.23. This variant introduces a premature stop codon, leading to the interruption of protein synthesis. The *SYP* gene encodes synaptophysin, a 313-amino acid integral membrane protein that is highly conserved among mammals. Synaptophysin plays a key role in synaptic vesicle endocytosis and is considered the most abundant synaptic vesicle protein. Pathogenic variants in the *SYP* gene have previously been associated with X-linked intellectual disability, frequently accompanied by epilepsy. In this context, the clinical characteristics evidenced in the present study have already been reported in the literature in relation to alterations in the *SYP* gene. However, in addition to the cited clinical signs, all affected male individuals evaluated present macrocephaly and psychiatric disorders, expanding the spectrum of clinical phenotype associated with the new variant in the *SYP* gene.

Keywords: Intellectual disability; Familial recurrence; X chromosome; *SYP* gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo dos estágios do neurodesenvolvimento, vinculados a fatores genéticos e ambientais associados à deficiência intelectual.....	18
Figura 2 - Genealogia da família.....	35
Figura 3 - Eletroferogramas do controle interno e do primeiro paciente do sexo masculino afetado pela condição.....	36
Figura 4 - Eletroferogramas do controle interno e do segundo paciente do sexo masculino afetado pela condição.....	37
Figura 5 - Resultado do sequenciamento do exoma completo.....	38
Figura 6 - Resultados da análise de co-segregação pelo sequenciamento de Sanger.....	39
Figura 7 - Sinaptofisina normal e alterada pela variante encontrada.....	40
Figura 8 - Interações do gene SYP.....	42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Mix para PCR multiplex com três <i>primers</i>	27
Tabela 2 - Mix para PCR multiplex com dois <i>primers</i>	27
Tabela 3 - Programa HOT-XFRA.....	28
Tabela 4 - Mix da Taq Polimerase.....	28
Tabela 5 - Programa XFRA.....	28
Tabela 6 - Mix de reagentes para análise de fragmento em sequenciador de DNA.....	29
Tabela 7 - Mix para PCR.....	32
Tabela 8 - Programa <i>Touchdown</i> 62.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DI	Deficiência intelectual
DND	Distúrbios do neurodesenvolvimento
XLID	Do inglês, <i>X-linked Intellectual Disability</i>
SXF	Síndrome do X-Frágil
FMR1	Do inglês, <i>FMRP translational regulator 1</i>
CGG	Citosina Guanina Guanina
FMRP	Do inglês, <i>Fragile X mental retardation protein</i>
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DMSO	Dimetilsulfóxido
Pb	Pares de base
TEA	Transtorno do Espectro Autista
CMA	Do inglês, <i>Chromosomal Microarray Analysis</i>
CNV's	Do inglês, <i>Copy Number Variations</i>
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
NGS	Do inglês, <i>Next-Generation Sequencing</i>
DSM	Do inglês, <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
SGC	Serviço de Genética Clínica
SEC	Sequenciamento do exoma completo
SGC	Sequenciamento do genoma completo
SUS	Sistema Único de Saúde
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana

LISTA DE SÍMBOLOS

∞	Infinito
μ	Micro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
©	Do inglês, <i>Copyright</i>
®	Marca Registrada
TM	Do inglês, <i>Trademark</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Deficiência intelectual.....	16
2.2 Etiologia da deficiência intelectual.....	17
2.2.1 Bases genéticas da deficiência intelectual.....	19
2.3 Métodos laboratoriais para a investigação etiológica de DI de base genética.....	22
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Geral.....	24
3.2 Específicos.....	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Casuística e obtenção de material biológico.....	25
4.2 Extração de DNA e quantificação.....	25
4.3 Análise do gene FMR1.....	25
4.4 Sequenciamento do exoma completo.....	29
4.5 Análise de patogenicidade das variantes genéticas.....	30
4.6 Sequenciamento de Sanger.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Características sociodemográfica e clínica da família investigada.....	34
5.2 Análise molecular.....	35
5.3 Análise genótipo-fenótipo.....	40
6 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI) é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, impactando a comunicação, aprendizagem e autonomia dos indivíduos acometidos (Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Etiologicamente, a DI apresenta alta heterogeneidade, podendo ser causada por fatores genéticos, ambientais ou uma combinação de ambos. A investigação das bases genéticas da condição pode ser fundamental, uma vez que alterações cromossômicas e gênicas representam uma parcela significativa das causas de DI grave no mundo. Contudo, cerca de 60% dos casos permanecem sem diagnóstico conclusivo, limitando o aconselhamento genético familiar e o manejo clínico (Topper et al., 2011; Han et al., 2018).

Estima-se que a DI atinja entre 1% e 3% da população global, com aproximadamente 1,2% dos casos registrados no Brasil, segundo dados epidemiológicos do censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revisado em 2019 (Topper et al., 2011; PNS/IBGE, 2019). No entanto, a realidade regional, especialmente no Nordeste brasileiro, revela disparidades significativas no acesso a diagnósticos precisos e intervenções especializadas, devido à carência de infraestrutura laboratorial e profissionais qualificados no âmbito da saúde pública.

Em Alagoas, o Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (SGC/HUPAA-UFAL), localizado na capital alagoana, destaca-se como a única unidade de referência em genética médica vinculada ao Sistema Único de Saúde (SUS). O SGC dispõe do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), local onde esta pesquisa foi conduzida, mantido por recursos de projetos de pesquisa, limitando assim o acesso das famílias em busca de diagnóstico e acompanhamento médico especializado. Apesar da atuação de instituições como a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) e a Associação Pestalozzi, que oferecem suporte multidisciplinar à pessoa com deficiência em Alagoas, a demanda por reabilitação intelectual (RI) também supera a capacidade de atendimento, deixando muitos indivíduos sem acompanhamento adequado.

Em relação às síndromes genéticas relacionadas à DI, as condições ligadas ao cromossomo X merecem atenção especial. A síndrome do X frágil (SXF), por exemplo, é a forma mais frequente de DI herdável, com prevalência elevada em homens. A investigação dessa síndrome em homens afetados por DI através de testes moleculares direcionados ao gene *FMRI* é importante, visto sua alta prevalência dentre as causas genéticas da DI, e

permite não apenas confirmar o diagnóstico, mas também evitar investigações desnecessárias caso o resultado for positivo, reduzindo custos e o tempo de espera das famílias (Ciaccio et al, 2017). Diante desse cenário, estudos que investiguem as bases genéticas da DI em famílias subdiagnosticadas e sem acesso à serviços especializados, como no Nordeste brasileiro, são essenciais para melhorar a precisão diagnóstica, orientar políticas públicas e garantir intervenções mais eficazes.

Diante desse contexto, foi realizada a investigação genética de um quadro de deficiência intelectual com padrão de recorrência familiar em indivíduos do sexo masculino provenientes de Piranhas, município do sertão alagoano, a fim de estabelecer um diagnóstico preciso e fornecer aconselhamento genético, visando preencher a lacuna diagnóstica identificada neste núcleo familiar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Deficiência intelectual

A deficiência intelectual (DI) é uma condição caracterizada por limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, que envolve habilidades conceituais, sociais e práticas (D'Ávila, 2022). Essa condição possui início na primeira infância e se perpetua até o fim da vida do indivíduo, sendo classificada no DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5ª edição) como leve, moderada ou grave. Ainda assim, o DSM-5 enfatiza que essa condição influencia três domínios na vida: o conceitual, que inclui conhecimento, raciocínio e memória; o social, que está ligado às interações sociais, como manter amizades e habilidades de comunicação; e o prático, que inclui cuidados pessoais e organização da vida diária.

Quanto à epidemiologia, a DI constitui um problema de extrema relevância social, educacional e de saúde, e sua prevalência global varia entre 1% e 3%. Apesar da sua ocorrência global, tende a haver maior prevalência de DI em áreas de nível socioeconômico mais baixo (Dave, Shetty & Mehta, 2005). Além disso, a ocorrência da deficiência intelectual também está associada com o sexo do paciente, sendo 1,5 vezes mais prevalente em homens do que em mulheres (Maulik et al., 2011; Lee, Cascella & Marwaha, 2023). No Brasil, de acordo com o Censo Demográfico 2010 revisto em 2019, divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a prevalência de pessoas classificadas com “deficiência

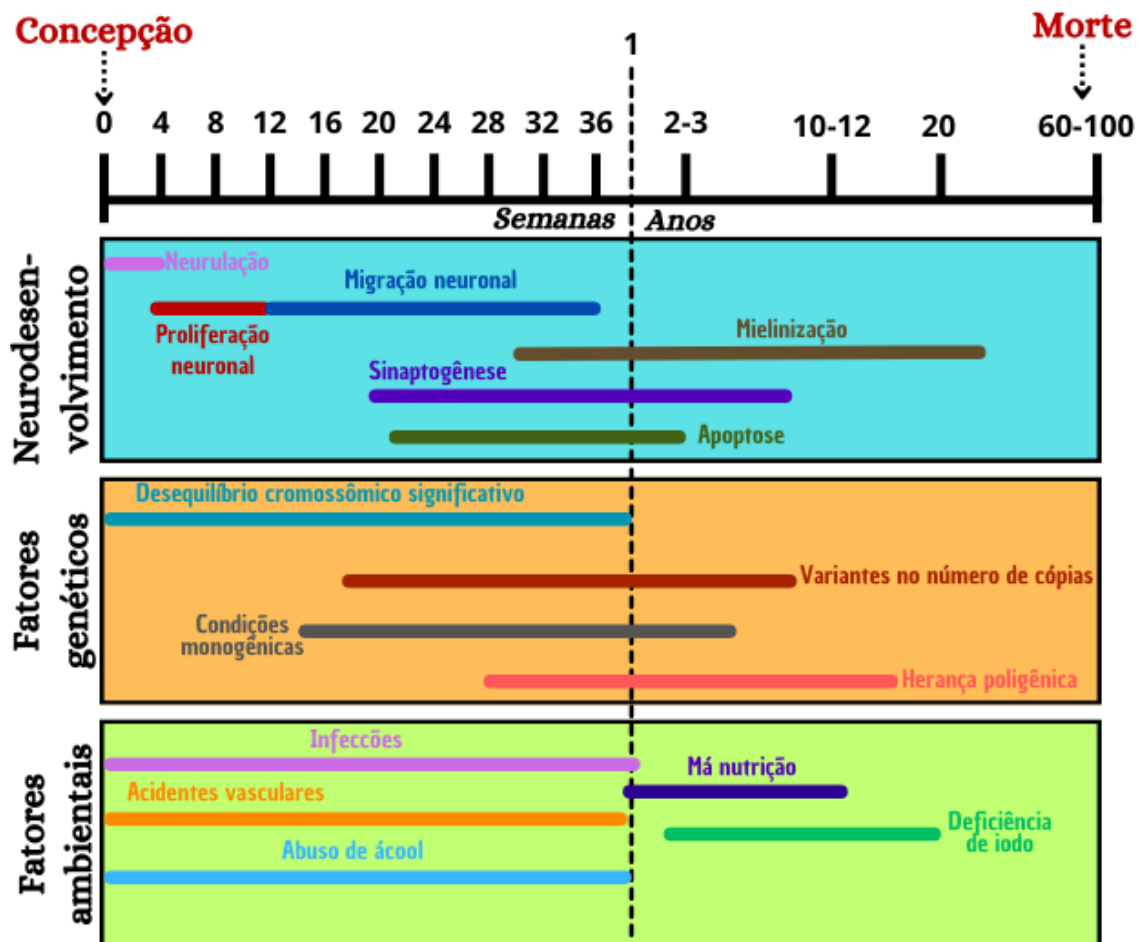
intelectual ou mental” foi de 1,2% da população, o que representava, na época, aproximadamente 2,6 milhões de indivíduos. Entretanto, a determinação dos fatores etiológicos são pouco conhecidos devido a inúmeros fatores, como a ausência de serviços médicos especializados e a pobreza da população.

A DI é heterogênea tanto no aspecto clínico quanto etiológico. Em comparação com a população geral, indivíduos acometidos com DI têm maior prevalência de associação à distúrbios neurológicos, deficiências sensoriais, malformações congênitas, epilepsias, entre outras comorbidades (Liao et al., 2021; Jansen, Vissers & Vries, 2023). Podendo ser, portanto, agrupada em DI síndrômica ou não síndrômica. A forma síndrômica é caracterizada pela presença de uma ou mais comorbidades e/ou por dismorfismos faciais associados. Em oposto, a DI não síndrômica é definida quando não há características síndrômicas evidentes, sendo a única manifestação observada no paciente. No entanto, indivíduos com essa condição podem apresentar anomalias neurológicas e transtornos psiquiátricos sutis, cujo diagnóstico é dificultado pelo comprometimento cognitivo (Kaufman et al., 2010).

2.2 Etiologia da deficiência intelectual

A ampla variabilidade fenotípica da DI e sua heterogeneidade etiológica estão associadas ao enorme desafio que pode ser determinar a sua causa. Em uma parcela significativa de crianças com DI, a causa permanece sem elucidação, mesmo após investigação genética avançada, com estudos reportando taxas de não diagnóstico entre 40-60% (Bass et al., 2018). Entre as numerosas causas conhecidas, sejam genéticas ou ambientais, elas ainda podem estar correlacionadas, interagindo entre si, de maneira que torna ainda mais complexo a investigação da DI (Cardoso et al., 2019). Conforme ilustrado na Figura 1, a maioria desses fatores exerce seus efeitos durante o período pré-natal, fase crítica para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Essa janela de vulnerabilidade ocorre por causa dos processos fundamentais que ocorrem nesse período, como a proliferação e migração neuronal, a formação de sinapses e a mielinização. Dessa maneira, a interação entre predisposição genética e exposições ambientais adversas pode amplificar os riscos, levando a alterações significativas no neurodesenvolvimento (Chiurazzi & Pirozzi, 2016).

Figura 1 - Esquema representativo dos estágios do neurodesenvolvimento, vinculados a fatores genéticos e ambientais associados à deficiência intelectual



Fonte: Adaptada de Chiurazzi & Pirozzi, 2016.

A maioria das formas graves de DI é causada por defeitos genéticos, que variam desde anomalias cromossômicas à alterações patogênicas em um único gene e até mesmo alterações epigenéticas (Najmabadi et al., 2011; Topper et al., 2011). Por outro lado, a etiologia ambiental está associada a diversos aspectos, como a exposição materna a toxinas ou agentes infecciosos, condições médicas irregulares durante a gestação, complicações no parto e traumas pós-natal (Lee, Cascella & Marwaha, 2023). A partir disso, é importante destacar a existência de transtornos do neurodesenvolvimento reconhecidos associados às causas ambientais, cromossômicas e genéticas; destacando-se o transtorno do espectro alcoólico fetal, ligado ao fator ambiental; a síndrome de Down, relacionada à alteração cromossômica; e a síndrome do X-frágil, associada a causa monogênica (Hangerman & Hangerman, 2021; Protic et al., 2022; Lee et al., 2023).

Em relação ao uso abusivo de álcool na gravidez, esta substância é uma das maiores causadoras de DI relacionada à exposição ambiental, pois o contato do álcool com o feto inibe a produção de ácido retinóico, que é uma molécula sinalizadora essencial para o neurodesenvolvimento (Denny et al., 2017). Outrossim, os agentes infecciosos mais comuns e conhecidos que ocasionam a DI são a rubéola e o HIV. Ligado a isso, a infecção por rubéola no trimestre inicial da gravidez leva à DI em aproximadamente 15% dos casos, podendo aumentar para 50% se a infecção ocorrer no primeiro mês da gestação (Biellik & Orenstein, 2018). Quanto ao HIV, o vírus pode ser transferido verticalmente de mãe para filho, podendo desenvolver, posteriormente, convulsões, encefalopatia e DI nos filhos afetados. Além disso, outras exposições infecciosas como a doença da inclusão citomegálica, a sífilis e a toxoplasmose também podem causar DI. Dessa maneira, enfatiza-se a importância da vacinação materna e também a utilização de terapia antirretroviral, nos casos de HIV, a fim de prevenir a genitora e, posteriormente, reduzir a transmissão das infecções para seus filhos (Mitchell, 2006; Lee et al., 2023). Além disso, é importante destacar que todas as etiologias ambientais, sejam por teratógenos ou outros fatores, são passíveis de prevenção primária por meio de educação em saúde e ações diretas para a melhoria da atenção à mulher no pré-natal, parto e ao recém-nascido.

A determinação da etiologia da DI tem várias implicações para a família dos afetados. O diagnóstico frequentemente ajuda a família a compreender o prognóstico da doença, a definir o tratamento mais apropriado caso esteja disponível e a estimar o risco de recorrência, principalmente, quando a DI for causada por fatores genéticos. Além do comprometimento financeiro, cuidar de pessoas com DI pode ter efeitos sociais e emocionais substanciais na família do afetado (Topper et al., 2011).

2.2.1 Bases genéticas da deficiência intelectual

De acordo com o OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), mais de 1000 genes estão atualmente associados à DI, estes possuem funções intrínsecas ligadas ao neurodesenvolvimento. Além disso, a atual estatística inclui síndromes genéticas específicas e formas não sindrômicas de DI. O aumento gradativo da quantidade de genes associados à condição está relacionado com os avanços nas tecnologias de sequenciamento que contribuem para a elucidação de casos complexos, visto que a alta heterogeneidade da DI problematiza o processo de obtenção do diagnóstico clínico e genético (Jansen et al., 2023).

A DI é causada principalmente por determinantes genéticos, porém as causas específicas de muitas ocorrências ainda não foram elucidadas devido a complexidade do genoma humano e a interação dos genes com o ambiente (Chiurazzi et al., 2020; T. Quach et al., 2020). A DI é uma condição que pode ser causada por uma variedade de alterações genéticas, as quais podem ser herdadas dos genitores ou surgirem de forma espontânea (alterações *de novo*). As alterações mais prevalentes associadas à deficiência intelectual incluem: síndromes cromossômicas, alterações em genes específicos e variações nos números de cópias (CNVs, *Copy Number Variations*) (Jansen et al., 2023). Em relação às síndromes cromossômicas, a síndrome de Down é uma das condições genéticas mais comuns que afetam indivíduos em todo mundo, sendo caracterizada pela presença de uma cópia extra do cromossomo 21. Esta síndrome possui diversas manifestações clínicas e fenotípicas que podem variar em gravidade e complexidade, sendo a DI a principal característica associada à síndrome (Santana et al., 2025).

As anomalias cromossômicas estão entre os principais mecanismos genéticos envolvidos na DI, destacando-se por sua elevada frequência. Dados epidemiológicos, obtidos a partir de estudos de coorte, demonstram que essas alterações correspondem a aproximadamente 15-20% dos casos com etiologia genética definida (Vissers et al., 2016). A síndrome de Down, como mencionado, é o principal exemplo. Todavia, outras alterações numéricas (como as trissomias 13 e 18) e estruturais (como a síndrome de DiGeorge por deleção 22q11.2) também contribuem significativamente, sendo esta última presente em aproximadamente 1 a cada 4.000 nascimentos (Cortés-Martín et al., 2022).

Já as causas monogênicas, embora individualmente raras, coletivamente respondem por aproximadamente 10-15% dos casos (Vissers et al., 2016). Distúrbios do metabolismo como a fenilcetonúria, que afeta 1 em cada 10.000 recém-nascidos e possui protocolos estabelecidos de triagem neonatal, contrastam com síndromes ligadas ao X, como a do X frágil, que ocorre em 1 a cada 4.000 homens (Mila et al., 2018). Contudo, as variações no número de cópias (CNVs) e as alterações *de novo* têm ganhado destaque nos últimos anos, graças aos avanços em sequenciamento genômico. Estudos de coorte demonstraram que alterações espontâneas (CNVs *de novo*) explicam 30-40% dos casos graves de DI sem história familiar, com exemplos notáveis sendo as deleções 16p11.2 (presentes em 1% dos casos de autismo com DI) e as duplicações 15q11-q13 (associadas a indivíduos com DI) (Zarrei et al., 2019; Coe et al., 2019).

Diante do histórico familiar com maior recorrência e gravidade do quadro clínico nos indivíduos do sexo masculino analisados no presente estudo, nossa hipótese inicial era de que se tratava de uma deficiência intelectual ligada ao X. A deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (XLID, *X-linked Intellectual Disability*) é uma condição geneticamente heterogênea que afeta principalmente indivíduos do sexo masculino (Neri et al., 2018). De acordo com o banco de dados SysNDD (*Systems Biology of Neurodevelopmental Disorders*), a XLID está associada a alterações patogênicas em mais de 198 genes. Sobre isso, o cromossomo X apresenta uma alta variabilidade de genes que são expressos no cérebro e estão relacionados a processos importantes no desenvolvimento neuronal. Cerca de 20% desses genes estão associados a distúrbios do neurodesenvolvimento, possuindo mais prevalência em indivíduos masculinos, visto que a hemizigosidade da maioria dos genes ligados ao X revela fenótipos recessivos em homens, diferentemente das mulheres, por possuírem um método de compensação de dose gerado pela inativação do cromossomo X, garantindo o equilíbrio no nível de expressão gênica entre indivíduos masculinos e femininos. Diante disso, mulheres acometidas com uma mesma variante patogênica que um indivíduo masculino, nessa condição, geralmente são levemente afetadas ou não afetadas (Brand et al, 2021; Rodrigues et al, 2022).

Dentre as condições associadas à XLID, destaca-se a síndrome do X-frágil (SXF) citada anteriormente, sendo considerada a segunda causa mais comum da DI e a principal causa hereditária dessa condição. A SXF é causada por uma expansão instável de uma trinca de nucleotídeos (CGG - Citosina Guanina Guanina)_n na região 5' não traduzida do primeiro exon do gene *FMRI* (FMRP, *translational regulator 1*). Essa expansão resulta na hipermetilação da região promotora do gene, levando ao seu silenciamento e, consequentemente, à perda ou redução significativa da expressão da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). A FMRP é essencial para o desenvolvimento neurológico, e sua ausência ou redução está diretamente associada às manifestações clínicas da síndrome (Sitzmann et al., 2017; Ciaccio et al., 2017). Devido ao caráter monogênico ligado ao X dessa síndrome, a prevalência de indivíduos masculinos afetados é maior, uma vez que eles possuem apenas um cromossomo X. Em homens, a alteração patogênica no gene *FMRI* resulta na completa ausência ou redução significativa da proteína FMRP, levando a manifestações clínicas mais graves, como DI, autismo, hiperatividade e características físicas distintivas como orelhas proeminentes e face alongada. Em oposto, as mulheres possuem dois cromossomos X, apresentando um alelo normal que pode atenuar os sintomas, resultando em

fenótipos mais leves ou até mesmo assintomáticos, dependendo do padrão de inativação do cromossomo X afetado (Sitzmann et al., 2017; Brand et al., 2021).

2.3 Métodos laboratoriais para a investigação etiológica da DI de base genética

O processo investigativo laboratorial da etiologia genética da DI pode envolver diversas técnicas, desde métodos citogenéticos tradicionais até abordagens genômicas avançadas. Esses métodos permitem a identificação de alterações cromossômicas ou em genes específicos, variações no número de cópias (CNVs) e outras alterações genéticas associadas à DI. Dentre eles, destacam-se técnicas como: o cariótipo convencional, a análise de microarray cromossômico CMA (*Chromosomal Microarray Analysis*), a hibridização in situ fluorescente FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), bem como o sequenciamento de nova geração NGS (*Next-Generation Sequencing*) que agrupa o sequenciamento do exoma completo (SEC) e o sequenciamento do genoma completo (SGC) (Vissers et al., 2016; Srivastava et al., 2019; Van der Sanden et al., 2023).

O cariótipo tem sido utilizado para detectar alterações cromossômicas numéricas e estruturais, como a síndrome de Down. Contudo, esse método é limitado em sua resolução, detectando apenas alterações com tamanho $\geq 5\text{--}10$ Mb. Dentro desse âmbito, a análise de microarray cromossômico se tornou o teste clínico prioritário para detectar CNVs em pacientes afetados com DI sindrômica não reconhecida, associada à atraso global do desenvolvimento, transtorno do espectro autista (TEA) e/ou anomalias congênitas múltiplas (Leite et al., 2022). Em relação à técnica FISH, esta é um método citogenético utilizado na detecção e localização de sequências específicas de DNA e RNA em cromossomos, células e tecidos. Geralmente, o método de FISH é utilizado em condições nas quais métodos citogenéticos convencionais, como o cariótipo, não possuem resolução correta na identificação de alterações genéticas específicas (Cui, Shu, & Li, 2016). Todavia, apesar das técnicas específicas desenvolvidas, muitos casos de DI sindrômica permanecem sem a devida elucidação (Leite et al., 2022).

Diante disso, o NGS tem revolucionado a investigação genética da DI, permitindo a identificação de alterações em genes específicos, a elucidação de causas anteriormente desconhecidas e a análise simultânea de milhares de genes, com alta precisão e resolução (Harripaul et al., 2017). Dentre as técnicas do NGS, o SEC destacou-se como uma ferramenta essencial, pois foca em regiões codificantes do genoma, onde se concentram a maioria das alterações patogênicas. Estudos recentes mostram que o SEC tem uma taxa de diagnóstico de

aproximadamente 30% em casos de DI sem causa conhecida, tornando-se um teste de primeira linha em países desenvolvidos (Jansen et al., 2023). Contudo, o SGC destaca-se como uma alternativa ainda mais abrangente, pois este analisa todo o genoma, incluindo regiões codificantes e não codificantes, como promotores, *enhancers* e introns, que também podem abrigar variantes patogênicas. Essa abordagem é utilizada para identificar alterações em regiões regulatórias, variações estruturais, como grandes deleções e duplicações, além de rearranjos cromossômicos complexos (Strande et al., 2022). Porém é um método caro e seus resultados demandam maior capacidade computacional para as análises dos dados (Clark et al., 2018).

Embora os éxons representem apenas 1-2% do DNA total, eles contêm aproximadamente 85% das alterações conhecidas por causar doenças genéticas, tornando o SEC uma ferramenta eficaz para a identificação de variantes patogênicas (Strande et al., 2022). Uma das principais vantagens do SEC é sua alta resolução, que permite detectar alterações pontuais, pequenas inserções/deleções e variantes de significado incerto com grande precisão (Posey et al., 2019). Ademais, o SEC é custo-efetivo em comparação com o sequenciamento do genoma completo, pois foca nas regiões mais relevantes do genoma, reduzindo custos e simplificando a análise (Clark et al., 2018). Outra vantagem significativa é sua ampla cobertura, que permite analisar todos os genes conhecidos em um único teste, sendo útil para condições geneticamente heterogêneas, como a DI (Wright et al., 2018).

No entanto, o SEC também apresenta limitações. Por exemplo, ele não detecta variantes em regiões não codificantes ou regulatórias do genoma, que podem ser críticas para o desenvolvimento de algumas doenças (Strande et al., 2022). Além disso, a interpretação dos dados do SEC pode ser complexa, exigindo análises bioinformáticas robustas e bancos de dados atualizados para distinguir variantes patogênicas de polimorfismos comuns (Posey et al., 2019). Um desafio adicional é a frequente identificação de variantes de significado incerto, que exigem estudos funcionais adicionais para determinar seu impacto clínico (Strande et al., 2022). Apesar de suas limitações, o SEC tem sido fundamental para o diagnóstico de síndromes genéticas raras e para a descoberta de novos genes associados à DI, pois ele supera os métodos tradicionais de diagnóstico ao fornecer uma análise genética mais abrangente, consolidando-se como uma ferramenta indispensável na genética médica moderna (Wright et al., 2018; De Boer et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar investigação molecular da causa da deficiência intelectual recorrente em homens em uma família oriunda da cidade de Piranhas, localizada no sertão de Alagoas.

3.2 Específicos

- Caracterizar fenotipicamente os membros afetados da família;
- Investigar o gene *FMRI* associado à síndrome do X-frágil nos membros afetados da família;
- Investigar possíveis outras causas genéticas associadas ao fenótipo clínico;
- Estabelecer relação genótipo-fenótipo.

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística e obtenção de material biológico

Durante trabalho de campo no sertão de Alagoas, identificamos no município de Piranhas/AL, através de busca ativa junto aos agentes comunitários de saúde, a família investigada neste estudo; um núcleo familiar com dez integrantes (genitores e seus oito filhos) que apresenta casos recorrentes de DI no histórico familiar, principalmente entre indivíduos do sexo masculino. Foi realizada a coleta de material biológico (saliva e/ou sangue) de cinco indivíduos (mãe, pai, irmã e dois irmãos afetados com clínica sugestiva para XLID) e, posteriormente, as amostras foram direcionadas ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (LGMH/HUPAA/UFAL), onde foram realizados os devidos protocolos. A mencionada pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFAL em 2021 (CEP - CAAE: 39674220.1.1001.5013). Todos os participantes e/ou seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 Extração de DNA e quantificação

Em laboratório, as amostras de sangue foram recebidas e as informações dos respectivos pacientes foram inseridas no banco de dados de pacientes do LGMH. Posteriormente, a extração do DNA genômico foi feita utilizando a metodologia de lise de leucócitos com proteinase K, após isso, a purificação fenólica foi realizada (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Ao final do protocolo, o DNA foi eluído em 200µl de solução tampão TE 1x (LGC®). No dia subsequente, as amostras passaram por quantificação em um quantificador de ácidos nucleicos (BioDrop®), para verificação, em 1 µl, da concentração de cada amostra, assim como suas razões de pureza e integridade. Por fim, as amostras foram armazenadas em refrigerador ideal para devida conservação no banco de DNA do LGMH.

4.3 Análise do gene *FMRI*

Após os processos anteriormente citados, as amostras de DNA com concentração de 50ng/µl foram direcionadas para a realização de PCR multiplex, consistindo na utilização de dois e três *primers*, um deles marcado com fluorescência, segundo protocolo adaptado de: Haddad, L.A. et al. (1996) e protocolo utilizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco – USP.

Devido às características únicas da alteração da SXF, foram utilizados reagentes com funções específicas para garantir uma boa amplificação das regiões de interesse, sendo estes: o 7-deaza dGTP, agente potencializador de amplificação de trechos de DNA que são ricos em CG; dimetilsulfóxido (DMSO), reagente necessário para a amplificação de trechos de DNA que apresentam grandes repetições de nucleotídeos, além de inibir a formação de estruturas secundárias no molde de DNA e nos *primers*. Ademais, como característica essencial da PCR multiplex, foi utilizado um terceiro *primer* para que também seja amplificada uma região do DNA com o tamanho de 223 pb (pares de base), funcionando como controle interno da reação.

As amplificações foram realizadas em duas reações distintas para cada indivíduo analisado, utilizando 2 µl de DNA por reação em microtubos de 0,2 ml. Para isso, foram preparados dois mix de reagentes para a PCR: um contendo três *primers* (Tabela 1) e outro com dois *primers* (Tabela 2). Essa abordagem permitiu que os resultados das duas reações servissem como confirmação mútua para cada paciente. As reações foram então inseridas no termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems®), iniciando com o programa “HOT-XFRA” para a desnaturação do DNA (Tabela 3). Após essa etapa, foi preparado um mix em um microtubo de 0,5 ml contendo água ultrapura, tampão 10x e a enzima Taq Polimerase Platinum (Tabela 4). Em seguida, 2 µl desse mix foram adicionados a cada microtubo com as amostras desnaturadas, que permaneciam no termociclador. As reações foram então submetidas ao programa “XFRA” para a amplificação (Tabela 5). Vale ressaltar que alguns reagentes utilizados nas reações de PCR foram preparados e armazenados previamente, conforme especificado a seguir:

- dNTP (1,25mM - 75% 7deaza dGTP): Num microtubo, foi homogeneizado 5µl dATP (100mM), 5µl dTTP (100mM), 5µl dCTP (100mM), 1,25µl dGTP (100mM), 37,5µl 7 deaza dGTP (10mM) e 346,25µl H2O MilliQ (Total: 400µl). Posteriormente, foi estocado em freezer -20°C;
- MIX com 2 *primers* (7,5uM Eag-U-6FAM / 7,5uM f): Num microtubo, homogeneizar: 7,5µl primer Eag-U (100uM), 7,5µl primer f (100uM) e 85µl H2O MilliQ (Total: 100µl). Logo após, foi estocado em freezer -20°C;
- MIX com 3 *primers* (7,5uM Eag-U-6FAM / 5uM f / 2uM Eag-L): Num microtubo, homogeneizar: 7,5µl primer Eag-U (100uM), 2uL primer Eag-L (100uM), 5µl primer f

(100uM) e 85,5µl H₂O MilliQ (Total: 100uL), sendo estocado, posteriormente, em freezer -20°C.

Os primers utilizados para a amplificação das amostras de DNA genômico dos indivíduos foram os seguintes:

- *Primer Fwd* - Eag-U – 5' 6FAM-cgacctgtcaccgcccttcagccttc 3'
- *Primer Rev-1* - Eag-L – 5' cgctgcgggtgtaaacactgaaaccacgtc 3'
- *Primer Rev-2* - f – 5' agccccgcacttcaccaccagctcctcca 3'

Tabela 1 - Mix para PCR multiplex com três *primers*

Reagente/amostra	Volume para uma reação (µl)
H ₂ O ultrapura	10,2 µl
Tampão 10x	2,3 µl
MgCl ₂ (50mM)	1 µl
dNTP 1,25mM - 75% 7deaza dGTP	4 µl
MIX 3 <i>primers</i> (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2 uM Eag-L)	1 µl
Dimetilsulfóxido (DMSO)	2,5 µl
DNA (50ng/µl)	1 µl
Total	23 µl

Tabela 2 - Mix para PCR multiplex com dois *primers*

Reagente/amostra	Volume para uma reação (µl)
H ₂ O ultrapura	10,2 µl
Tampão 10x	2,3 µl
MgCl ₂ (50mM)	1 µl
dNTP 1,25mM - 75% 7deaza dGTP	4 l
MIX 2 Primers (7,5uM Eag-U / 5uM f)	1 µl
Dimetilsulfóxido (DMSO)	2,5 µl
DNA (50ng/µl)	1 µl
Total	23 µl

Tabela 3 - Programa HOT-XFRA

Temperatura	Tempo
98°C	10 minutos
72°C	∞

Tabela 4 - Mix da Taq Polimerase

Reagente	Volume para uma reação (μl)
H ₂ O ultrapura	1,48 μl
Tampão 10x	0,2 μl
Taq Polimerase Platinum (5U/μl)	0,32 μl
Total	2 μl

Tabela 5 - Programa XFRA

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	2 minutos	1X
65°C	1 minuto	35X
72°C	2 minutos	
94°C	1 minuto e 30 segundos	
72°C	20 minutos	1X
10°C	∞	

Posteriormente, os produtos amplificados foram preparados para análise no sequenciador de DNA (ABI 3500®); capaz de analisar fragmentos de até 1200 pb. Nessa etapa, foram adicionados dois reagentes essenciais: formamida Hi-Di, um agente desnaturante de ácidos nucleicos, e *size standard*, um marcador fluorescente utilizado para determinar o tamanho de alelos específicos de interesse, estimando alelos de até 600 pb (LIZ 600) ou 1200 pb (LIZ 1200). As quantidades de ambos os reagentes foram ajustadas de acordo com o número de reações, conforme especificado na Tabela 6. Após a preparação, as amostras foram submetidas à desnaturação no termociclador (*SimpliAmp Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*®) a 95°C por três minutos. Em seguida, foram resfriadas em gelo por, no mínimo, dois minutos e, finalmente, transferidas para o sequenciador de DNA para realização da corrida.

Tabela 6 - Mix de reagentes para análise de fragmento em sequenciador de DNA

Reagente	Volume para uma reação (µl)
Formamida Hi-Di	7,7 µl
Size standard (LIZ 600) ou (LIZ 1200)	0,3 µl
Amostra (produto da PCR)	2 µl
Total	10 µl

Após a amplificação da região polimórfica e a análise no sequenciador (ABI 3500®), os tamanhos esperados dos produtos podem ser classificados em três grupos distintos, conforme descrito a seguir:

- Indivíduo com alelos normais: 223bp (Eag-U e Eag-L) 488 a 632bp (Eag-U e f): até 54 repetições CGG
- Indivíduo com pré-mutação: 223bp (Eag-U e Eag-L) 635 a 1070bp (Eag-U e f): até 200 repetições CGG :
- Indivíduo com mutação completa: 223bp (Eag-U e Eag-L) ausência de banda (Eag-U e f): >200 repetições CGG

Ao final do processo de eletroforese capilar, são gerados eletroferogramas que apresentam picos referentes a região de interesse (expansão de repetição CGG), assim como o pico do controle interno, contido nas reações com três *primers*. Ambas as reações, com dois e com três *primers*, possuíam um deles marcado com fluorescência (6-FAM). A fim de realizar o diagnóstico, é observada a presença ou ausência de pico na região de repetição de trinucleotídeos, uma vez que regiões acima de 600pb estarão ausentes, pois são características de pré-mutação e de mutação completa. Dessa maneira, haverá pico de região de repetição apenas nos alelos de indivíduos normais para a síndrome. Os dados gerados foram analisados em software específico (*GeneMapper™ software 6*) para análise correta de fragmentos. Assim, foi possibilitado uma melhor visualização, interpretação e quantificação dos picos de fluorescência gerados nos resultados das amostras dos pacientes analisados.

4.4 Sequenciamento do exoma completo

Para investigar possíveis outras causas monogênicas associadas ao fenótipo clínico dos pacientes afetados foi realizado o SEC. Para isso, foi coletada saliva de um dos indivíduos afetados utilizando kit comercial específico fornecido pela empresa terceirizada para onde o material foi encaminhado para realização do SEC.

O protocolo empregado seguiu rigorosos padrões técnicos, incluindo: preparo de bibliotecas genômicas utilizando o sistema Illumina DNA com enriquecimento para as regiões alvo; captura exônica com o kit Twist Biosciences customizado versão 3, que abrange todas as regiões codificantes e adjacentes; e sequenciamento de nova geração na plataforma Illumina NovaSeq 6000 utilizando tecnologia de sequenciamento por síntese. Para análise dos dados, as leituras foram alinhadas à referência GRCh38/hg38 do genoma humano utilizando o algoritmo BWA-MEM (Burrows-Weeler Aligner). A identificação de variantes pontuais e pequenas inserções/deleções (indels) foi realizada com o *Genome Analysis Toolkit* (GATK) versão 4, enquanto variações no número de cópias (CNVs) foram detectadas pelo programa ExomeDepth. A interpretação das variantes foi conduzida através da plataforma Abracadabra®, desenvolvida pelo laboratório terceirizado, que integra múltiplas fontes de dados genômicos, incluindo OMIM, ClinVar e gnomAD (*The Genome Aggregation Database*) (versões v2.1.1 e v3.1.2) para análise de frequência alélica. A plataforma também incorpora algoritmos de inteligência artificial para predição *in silico* de patogenicidade. As variantes candidatas para seguir na investigação foram selecionadas com base nos seguintes critérios: raridade em populações controle, predição *in silico* de efeito deletério, associação conhecida com fenótipos neurológicos ou de distúrbios do neurodesenvolvimento (DND), e concordância com o padrão de herança familiar observado.

4.5 Análise de patogenicidade das variantes genéticas

A interpretação de variantes genéticas é um processo essencial na genética médica, pois possibilita a identificação de alterações no DNA potencialmente ligadas a doenças hereditárias. Para padronizar essa análise, o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP) desenvolveram diretrizes que classificam as variantes em cinco categorias: benigna, provavelmente benigna, de significado incerto (*VUS*), provavelmente patogênica e patogênica. Cada critério possui um peso específico. O nível muito forte (PVS1), por exemplo, aplica-se a variantes que causam perda de função em um gene já associado à doença. O nível forte (PS) considera fatores como mutações na mesma posição de variantes patogênicas conhecidas (PS1) ou evidências funcionais significativas (PS3). O nível moderado (PM) abarca critérios como a localização em regiões funcionais críticas da proteína (PM1) ou a ausência em bancos de dados populacionais (PM2). Por fim, o nível de suporte (PP) inclui elementos como a ocorrência com variantes patogênicas (PP5). Para variantes benignas, os critérios seguem a mesma lógica, com níveis como muito forte (BA1), aplicado quando a variante é frequente na

população geral, ou de suporte (BP4), baseado em predições computacionais favoráveis. Essa estrutura sistemática garante maior precisão na avaliação do potencial patogênico das variantes genéticas, auxiliando no diagnóstico e aconselhamento genético (Richards et al., 2015). Softwares como o *Franklin* (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>) utilizam essas diretrizes para avaliar a patogenicidade de variantes.

4.6 Sequenciamento de Sanger

Com o objetivo de analisar a co-segregação das variantes candidatas identificadas no SEC e o fenótipo da família, o sequenciamento de Sanger foi realizado utilizando amostras de DNA do pai, da mãe, da filha sem fenótipo clínico e de dois filhos acometidos pela DI.

Inicialmente, foi realizada uma PCR em duplicata (Tabela 7) utilizando 1 µl do DNA de cada indivíduo, a fim de verificar a amplificação correta da região de interesse do gene. Para isso, os seguintes reagentes foram utilizados: a enzima Taq DNA Polimerase, enzima crucial para a sintetização de novas cadeias de DNA, a partir de moléculas de DNA molde em temperaturas elevadas; BSA 1%, reagente que melhora a eficiência e a especificidade da amplificação das amostras; H₂O ultrapura; um reagente tampão; dNTP, agente auxiliador que atua como substrato para a síntese de DNA; e dois primers (*Exxtend*®; concentração: 100 pmol/µl) para analisar a variante candidata, os quais foram desenhados *in silico* no software *Primer3 Input* (v. 4.1.0) (<https://primer3.ut.ee/>), que gera primers automaticamente a partir de uma sequência genômica selvagem, e posteriormente, foram sintetizados por uma empresa terceirizada. Os primers desenhados foram submetidos a testes *in silico* de PCR utilizando o site UCSC In-Silico PCR (*UCSC Genome Browser*®) (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), a fim de avaliar sua especificidade em relação à região genômica-alvo antes da amplificação experimental.

Essas reações foram realizadas em termociclador (*SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems*®) com o uso do programa “*Touchdown 62*” (Tabela 8). Após isso, os produtos foram submetidos à corrida por eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação da sequência alvo específica, a partir da banda com peso molecular esperado. Com a confirmação da amplificação, os produtos amplificados foram purificados com a utilização do kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega*®) seguindo o protocolo do fabricante.

Tabela 7 - Mix para PCR

Reagente/amostra	Volume para uma reação (µl)
H ₂ O ultrapura	20,3 µl
Tampão 10x	3 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,7 µl
dNTP (2 uM)	2,5 µl
Primer (<i>Foward</i>) (20 pmol)	1 µl
Primer (<i>Reverse</i>) (20 pmol)	1 µl
BSA 1%	0,3 µl
Taq. DNA Polimerase (5U/µl)	0,2 µl
DNA	1 µl
Total	30 µl

Tabela 8 - Programa *Touchdown* 62

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°	4 minutos	18X
94°	30 segundos	
62°	40 segundos	
72°	2 minutos	
94°	30 segundos	16X
56°	40 segundos	
72°	2 minutos	
72°	10 minutos	1X
10°	∞	

Posteriormente, o sequenciamento de Sanger foi realizado com a utilização do kit comercial *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™)* conforme indicação do fabricante. As reações foram feitas em uma placa de 96 poços que foi levada para análise em um analisador de DNA (ABI 3500®) por eletroforese capilar. Com os resultados do sequenciamento, foram utilizados dois softwares para a análise de co-segregação: *CLC Sequencer Viewer 8.0* e *Chromas*. Ambos os softwares possuem ferramentas precisas para análise de variantes por meio de uma sequência nucleotídica ou eletroferogramas e estão disponíveis para download gratuito.

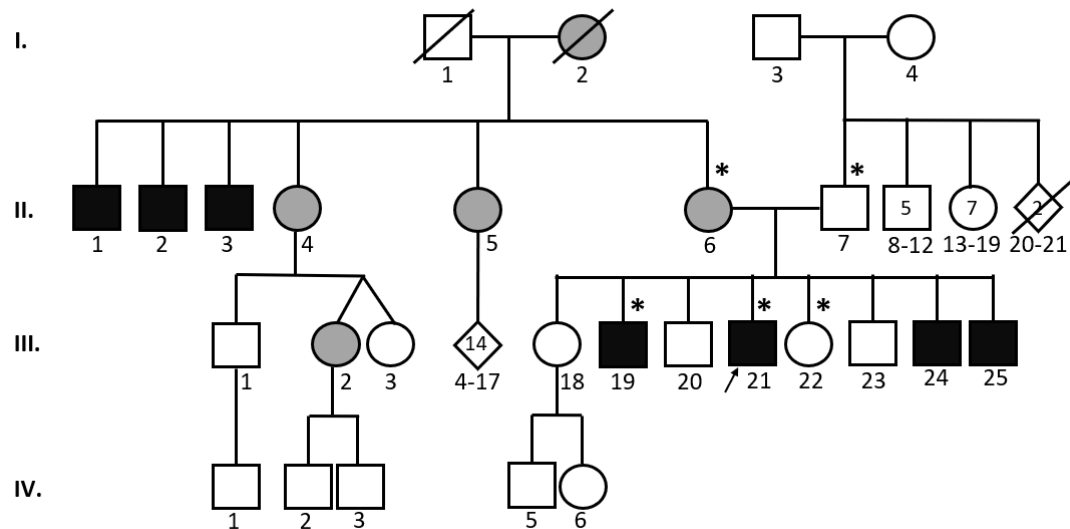
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características sociodemográfica e clínica da família investigada

A família investigada reside no sertão de Alagoas, em Piranhas, esta é composta por dez integrantes, sendo eles os genitores e seus oito filhos, separados em seis homens e duas mulheres (Figura 2). O histórico familiar analisado destacou a ausência da consanguinidade dos genitores e constatou possíveis casos de DI na parte materna, principalmente afetando os homens, conduzindo à investigação para possível causa genética de herança ligada ao X. A família compareceu em consulta ambulatorial especializada de genética médica, nos quais foram avaliados os participantes II-6, 46 anos; II-7, 57 anos; III-19, 26 anos; III-21, 22 anos; III-24, 16 anos e III-25, 14 anos (Figura 2), apenas o participante II-7, o pai, não apresentava DI. Gestação e parto sem intercorrências, quadro clínico caracterizado por hipotonia significativa, atraso severo do desenvolvimento neuropsicomotor, macrocefalia, deficiência intelectual grave, compreensão de comandos básicos, incapacidade na realização independente de atividades da vida diária, em associação com distúrbio psiquiátrico delirante e com heteroagressividade (III-19, III-21, III-24 e III-25), epilepsia (III-21), deficiência intelectual moderada (II-6). Desenvolvimento sexual secundário adequado. Não há alterações auditivas, visuais, cardiovasculares, respiratórias, dermatológicas, gastrointestinais, endocrinológicas, locomotoras ou neuromusculares.

A história familiar e avaliação clínica sugerem padrão de herança dominante ligada ao cromossomo X. A genitora possui traços da condição de maneira atenuada. De acordo com Migeon (2020), isso está relacionado ao processo de inativação do cromossomo X, que atua como um mecanismo de compensação de dosagem gênica. Durante a inativação, os cromossomos X são silenciados aleatoriamente, resultando em um mosaicismos celular em mulheres. Isso significa que elas possuem dois tipos de células em seus tecidos: algumas expressam o cromossomo X herdado da mãe, enquanto outras expressam o cromossomo X paterno. Esse mosaicismos reduz a expressão de variantes patogênicas presentes no cromossomo X, já que o gene com a alteração não está sendo expresso em todas as células. Como resultado, as mulheres tendem a ser menos afetadas por essas variantes em comparação aos homens, que possuem apenas um cromossomo X.

A indicação de herança dominante ligada ao X e os fenótipos observados, conduziram inicialmente para a investigação do gene *FMRI*, associado à síndrome do X-frágil.

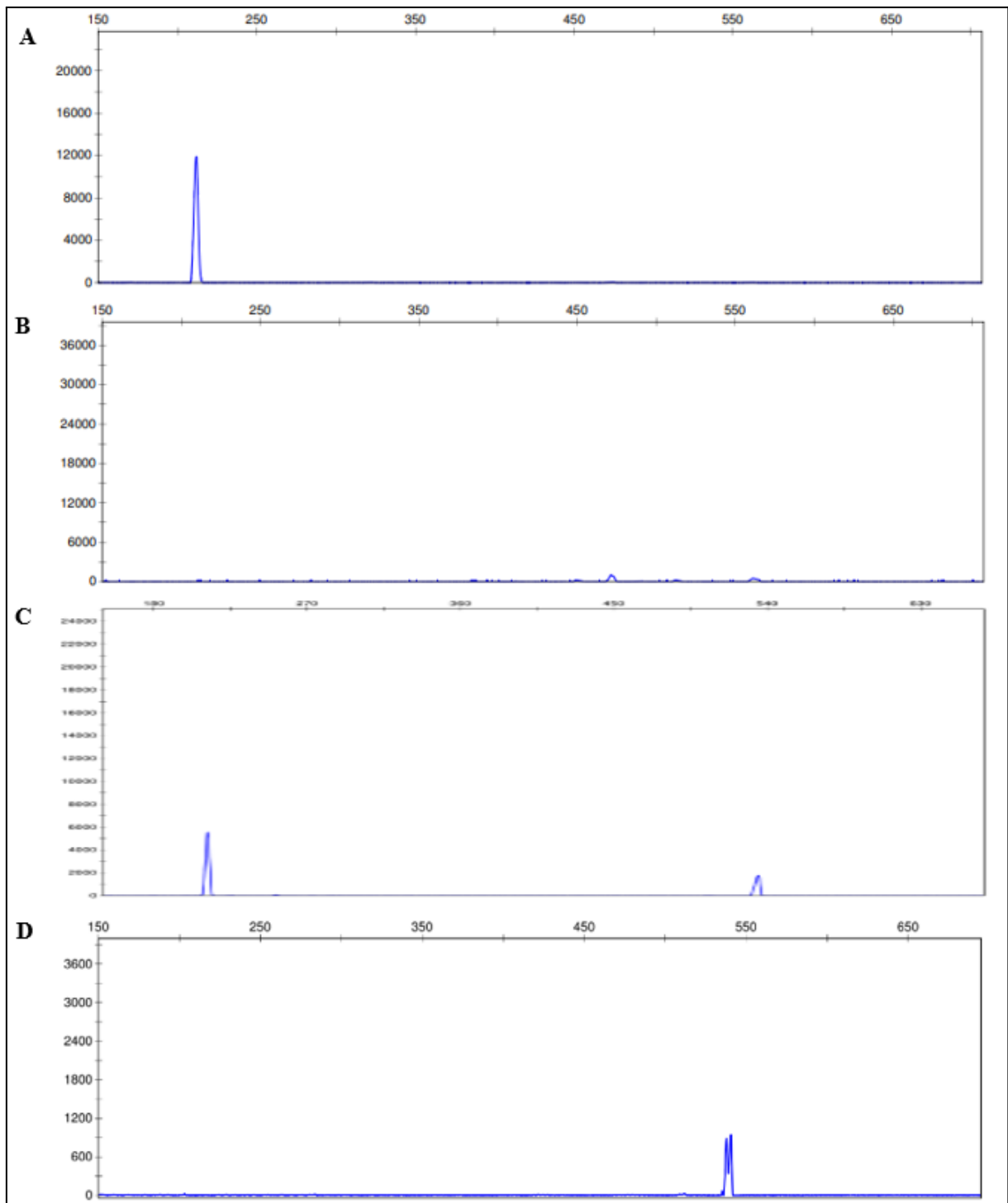
Figura 2 - Genealogia da família

Heredograma da família com quatro gerações. Participantes II-6, II-7, III-19, III-21, III-24 e III-25 realizaram avaliação genético-clínica. Indivíduos avaliados geneticamente*. Genitora (II-6) afetada de forma moderada em comparação aos filhos do sexo masculino (III-19, III-21, III-24 e III-25) que são afetados em maior grau, sugerindo padrão de herança ligada ao X dominante. Genitor (II-7) hígido e filha (III-22) hígida. Indivíduos I-2, II-1, II-2, II-3, II-4, II-5 e III-2 com relato de deficiência intelectual, não avaliados. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.2 Análise molecular

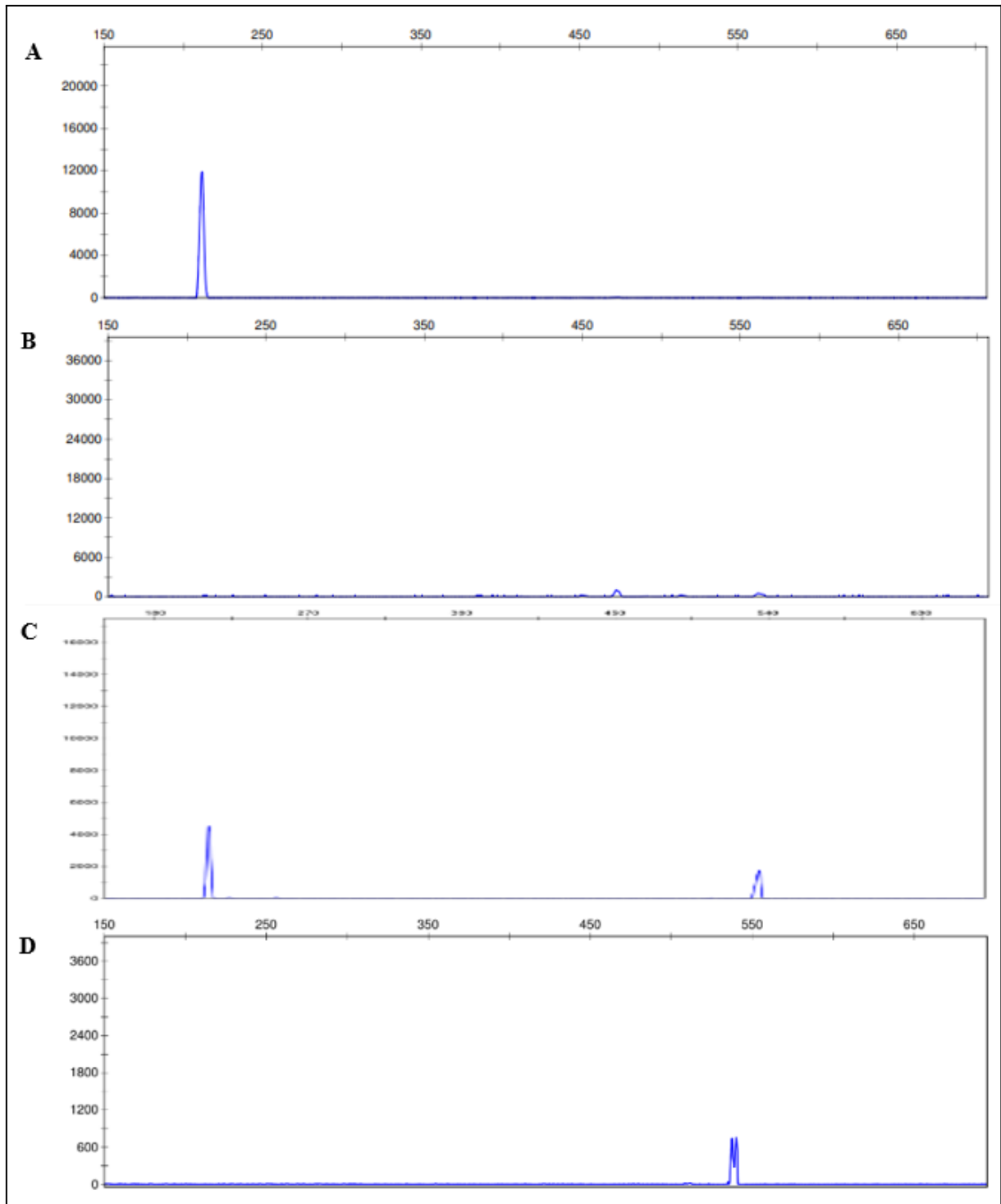
Foram investigados os pacientes com fenótipos mais graves (III-19 e III-21) para a síndrome do X-frágil. Na análise dos eletroferogramas da região de interesse do gene *FMRI*, foi possível observar que os dois pacientes não são portadores da mutação completa do gene *FMRI*, isso é notado na presença dos dois picos de amplificação da região de repetição CGG referentes às reações com três e dois *primers* nos eletroferogramas, mostrando que não houve expansão da trinca maior que 55 [(CGG)<55] e estando dentro do padrão de normalidade que é observado em até 600 pb (Figura 3 C-D; Figura 4 C-D) e passível de detecção pelo analisador de DNA. Em contrapartida, o paciente controle positivo não apresentou os picos de amplificação da região polimórfica em ambas as reações (com três e dois *primers*), indicando expansão da trinca maior que 55 [(CGG)>55] (Figura 3 A-B; Figura 4 A-B), não detectável pelo analisador de DNA. A eficácia dos resultados dos eletroferogramas foi observada na presença do pico de amplificação do controle interno com 223 pb em todos os pacientes analisados (controle e membros da família). A visualização deste pico era esperada em todas as reações, pois a amplificação em até 223 pb está fora da região polimórfica.

Figura 3 - Eletroferogramas do controle interno e do primeiro paciente do sexo masculino afetado pela condição



A-B: Paciente com mutação completa do gene *FMRI* (controle positivo (LIZ 600pb)) [(CGG)>200]. C-D: Primeiro paciente da família analisada, normal para x-frágil (LIZ 600pb) [(CGG)<55]. A e C: Mix com 3 primers; B e D: Mix com 2 primers. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 4 - Eletroferogramas do controle interno e do segundo paciente do sexo masculino afetado pela condição



A-B: Paciente com mutação completa do gene *FMRI* (controle positivo (LIZ 600pb)) [(CGG)>200]. C-D: Segundo paciente da família analisada, normal para x-frágil (LIZ 600pb) [(CGG)<55]. A e C: Mix com 3 primers; B e D: Mix com 2 primers. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Após o resultado molecular negativo para a síndrome do X-frágil, foi realizado o SEC de um dos pacientes (Figura 2, III-21), a fim de identificar possíveis outras causas de herança monogênica associadas ao fenótipo clínico presente na família analisada. Com os resultados obtidos do SEC, foi identificada uma alteração patogênica *nonsense* no gene *SYP*, localizado em *Xp11.23* (Figura 5). A variante encontrada é uma troca de citosina por timina, na posição 262 da região codificadora do gene, exon 4, ocasionando um *stop códon* prematuro na arginina 88 (c.262C>T; p.Arg88*). Essa variante foi predita *in silico* utilizando o software *Mutation Taster* como deletéria, além disso, ela não foi previamente reportada em bancos de dados populacionais (gnomaD e ClinVar), portanto, trata-se de uma variante nova.

Figura 5 - Resultado do sequenciamento do exoma completo

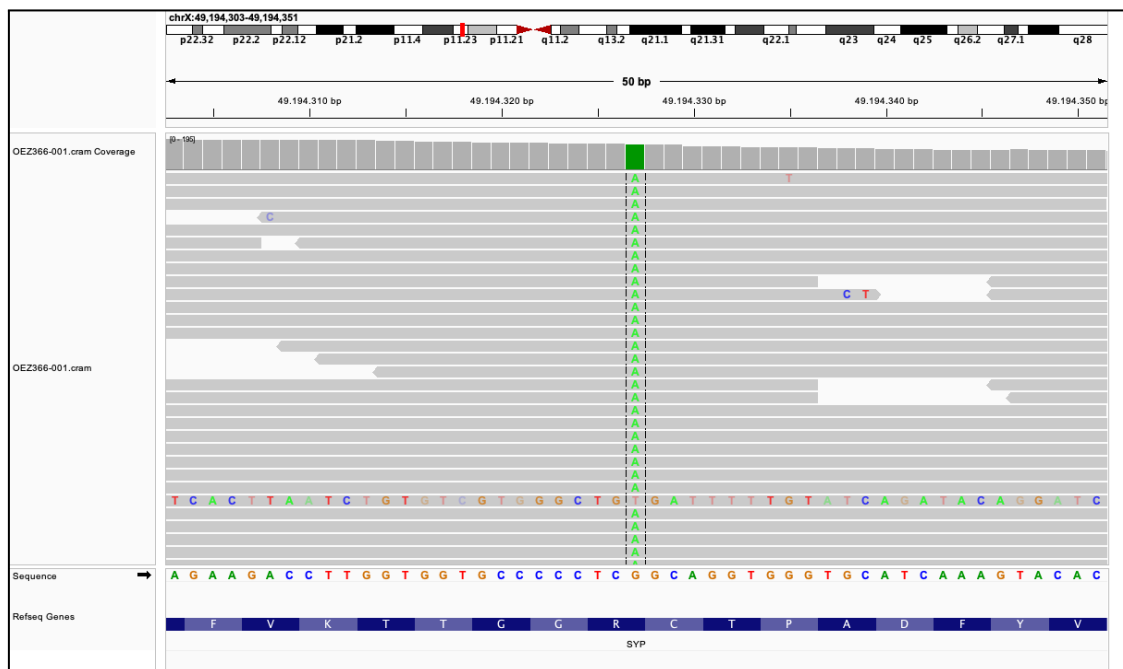
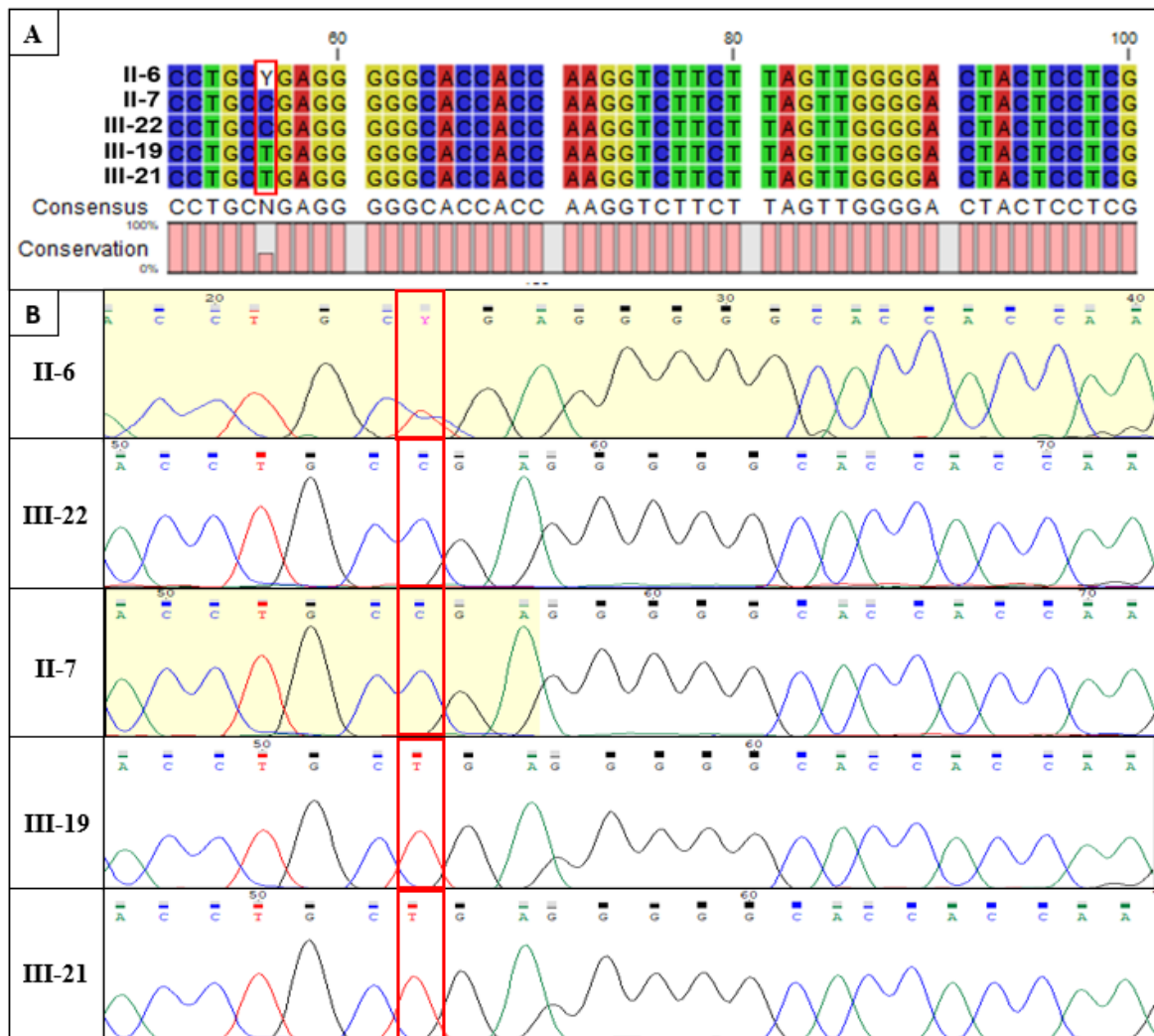


Imagem do sequenciamento do exoma completo do participante III-21. Visualização do arquivo BAM (*Binary Alignment Map*) no *Integrative Genomics Viewer* (IGV), destacando a região de 50 pares de bases (pb) que envolve a variante patogênica (c.262C>T; p.Arg88*) no éxon 4 do gene *SYP* (X:49.187.815-49.200.193). Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Dessa maneira, a variante foi selecionada para avaliação de co-segregação na família por meio do Sequenciamento de Sanger. Os resultados (Figura 6) demonstraram que a alteração genética está presente em hemizigose nos dois filhos afetados (III-19 e III-21). A genitora (II-6) foi identificada como heterozigota para a variante, exibindo ambos os alelos (C e T) em suas sequências, conforme evidenciado pelos picos correspondentes à citosina (azul) e timina (vermelho) no eletroferograma. Em contraste, o genitor (II-7) e a irmã (III-22) não

apresentaram a alteração, exibindo apenas o alelo com citosina na região analisada, o que confirma a ausência da nova variante nesses indivíduos. Esses achados corroboram a co-segregação da variante com o fenótipo de DI nos membros afetados da família, reforçando sua possível associação patogênica com a condição.

Figura 6 - Resultados da análise de co-segregação pelo sequenciamento de Sanger



Análise de co-segregação nos softwares *CLC Sequencer Viewer 8* (A) e *Chromas* (B) da variante c.262C>T nos genitores (II-6 e II-7) e filhos (III-22, III-19 e III-21) avaliados. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

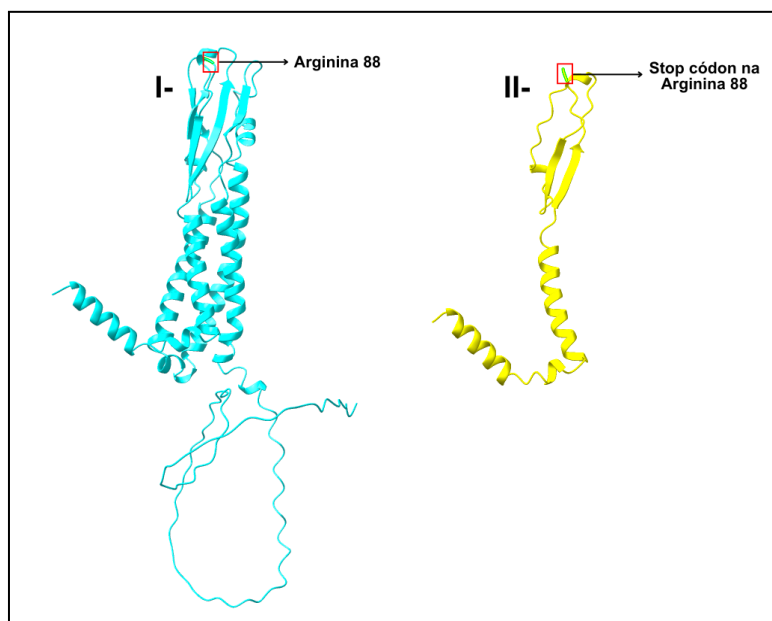
Para a classificação de patogenicidade da variante encontrada no presente estudo foi realizada uma análise utilizando o *Franklin*. Observou-se que a variante *nonsense* (c.262C>T; pArg88*) inclui critérios que a classificam como patogênica, seguindo as normas da ACMG. Entre os critérios aplicáveis, destaca-se PVS1 (nível muito forte), uma vez que a variante introduz um códon de parada prematura, levando à perda de função da proteína. Além disso, a ausência em bancos de dados populacionais (PM2) e evidências *in silico* que indicam impacto

deletério (PP3) reforçam essa classificação. Além da co-segregação da variante com o fenótipo na família (PP1).

5.3 Análise genótipo-fenótipo

Os genes localizados no cromossomo X possuem papel fundamental no processo do neurodesenvolvimento, devido a isso, alterações nesses genes são a principal causa de distúrbios do neurodesenvolvimento, um exemplo claro é a deficiência intelectual (Mir et al., 2023). O gene *SYP* (NM_003179.3), localizado no cromossomo X, é responsável pela expressão da proteína sinaptofisina (Figura 7, I), composta por 313 aminoácidos, altamente conservados entre os mamíferos. A sinaptofisina possui um segmento N-terminal curto seguido por quatro domínios transmembrana, que são regiões que atravessam a membrana das vesículas sinápticas, bem como uma cauda C-terminal longa. Ambas as extremidades estão localizadas na superfície citoplasmática das vesículas sinápticas, porém a cauda C-terminal é fosforilada. Diante do pequeno tamanho dessa proteína, alterações em sua estrutura agem de forma nociva em suas funções, pois seus domínios são essenciais para a interação com outros genes, interferindo, por exemplo, na liberação de neurotransmissores (Kwon; Chapman, 2011; Wang et al., 2024).

Figura 7 - Sinaptofisina normal e alterada pela variante encontrada



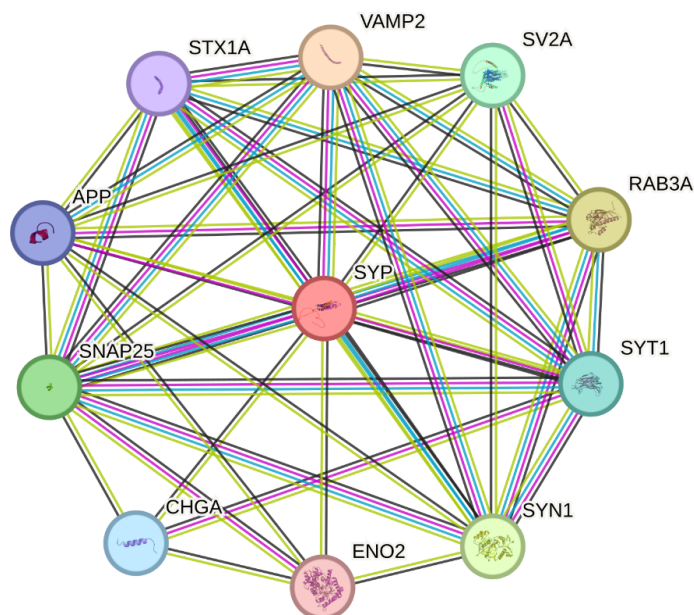
Comparação em 3D da proteína sinaptofisina em seu estado normal (I) e alterado com a variante encontrada (II), destacando o aminoácido afetado diretamente pela mutação. Estruturas feitas utilizando os softwares *Colab AlphaFold2* e *ChimeraX*. Análise realizada utilizando o software *UniProt*. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

A variante encontrada no presente estudo (c.262C>T; p.Arg88*) ocorre no exon 4 do gene *SYP*, truncando a sinaptofisina no domínio N-terminal citoplasmático, conforme mapeamento no UniProt (P08247) (UniProt Consortium, 2023). Esse *stop códon* prematuro na arginina 88 (Figura 7, II) elimina aproximadamente 70% da proteína, incluindo seus quatro domínios transmembrana que são necessários para a ancoragem vesicular da sinaptofisina, bem como sua estrutura C-Terminal que media a reciclagem das vesículas sinápticas (Takamori et al., 2006; Gordon, Leube & Cousin, 2011). A sinaptofisina (*SYP*) é um membro da família de proteínas integrais da membrana do domínio MARVEL, associada diretamente em processos de aproximação de membranas e transporte vesicular, porém seu papel fisiológico não foi completamente elucidado nesses processos (Arthur & Stowell, 2007). Ainda assim, essa proteína foi descrita como uma ferramenta utilizada para o sensor de cálcio, ligação ao colesterol e formação de canais iônicos através de sua bicamada fosfolipídica, todavia os resultados posteriores dessas funções são desconhecidos (White & Stowell, 2021).

A comunicação neuronal é fundamental para o funcionamento do sistema nervoso. Esse processo tem como base a exocitose induzida por Ca^{2+} , que possibilita a liberação de neurotransmissores, mecanismo essencial por sua atuação na regulação do humor e no aprimoramento da memória (White & Stowell, 2021). Além disso, a liberação de neurotransmissores é composta por etapas que auxiliam no direcionamento das vesículas sinápticas (VS) para zonas ativas pré-sinápticas, bem como a ancoragem e fusão desta com a membrana plasmática (Rehm, Wiedenmann & Betz, 1986; Sudhof, 2000). Esse transporte sináptico é regulado por um conjunto de mais de 30 proteínas, sendo uma delas a sinaptofisina que corresponde a 8% das proteínas encontradas nas VS. (White & Stowell, 2021).

O gene *SYP* possui interações com diversos genes (Figura 8), englobando genes que codificam as proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein Receptor*) como o *SNAP25* que gera a proteína SNAP-25; o *VAMP2* que é responsável pela produção de sinaptobrevina e o *STX1A*, responsável pela syntaxina. Essas proteínas realizam a fusão de vesículas com a membrana alvo, permitindo a liberação de neurotransmissores (Ramos-Miguel, 2018; Szklarczyk, 2023).

Figura 8 - Interações do gene *SYP*



Interações do gene *SYP*, nas quais as linhas coloridas representam a ligação dos componentes. Fonte: Feito com STRING-db.org (v 11,5) ©.

Bera e colaboradores (2023), descreveram um complexo formado entre as proteínas sinaptofisina e sinaptobrevina, no qual foi descrito como mecanismo essencial para a fusão ultrarrápida das vesículas sinápticas. Neste estudo, a formação dos *clusters* hexaméricos que a sinaptofisina consegue exercer na sinaptobrevina faz com que os SNAREpins, que são formados pela interação de proteínas SNARE e permitem a fusão de membranas para transporte vesicular e secreção celular, fossem organizados sob cada vesícula, conseguindo obter maior eficiência na liberação de neurotransmissores. Assim, nota-se que interrupções nos componentes bases do processo de liberação da vesícula sináptica ocasionam efeitos deletérios na comunicação neuronal que se refletem no organismo, provocando distúrbios neurológicos, como epilepsia, depressão e neurodegeneração (Ramos-Miguel et al., 2018; White & Stowell, 2021).

Em um estudo de 2009, Tarpey e seus colaboradores sequenciaram éxons codificantes no cromossomo X em várias famílias com DI, identificando quatro alterações independentes do gene *SYP* em quatro famílias distintas. A primeira identificada foi uma variante *nonsense* (c.274_275insA; p.Thr92fs*45) não recorrente e envolvida diretamente no caso da DI na família investigada. As demais alterações patogênicas foram encontradas em outras três famílias, sendo duas variantes *nonsense*: c.177_178CA>GT; p.N59_Lys604Lys* e c.829_832delGACT; p.Asp277fs*59, além de uma alteração *missense*: c.649GC;

p.Gly217Arg, que segregaram com o fenótipo dos indivíduos afetados investigados. Foi abordado que as famílias acometidas pelas três últimas variantes descritas apresentam DI leve a moderado entre seus indivíduos afetados, bem como ocorrências de epilepsia e distúrbios neurológicos, porém sem características adicionais consistentes.

Portanto, nota-se que parte do fenótipo dos indivíduos afetados neste estudo, particularmente a DI moderada a grave e a epilepsia, converge com os achados prévios de Tarpey et al. (2009). Contudo, características como macrocefalia e distúrbios psiquiátricos, identificadas na família analisada, não foram descritas no estudo anterior, sugerindo uma possível expansão do espectro fenotípico associado à condição. Além disso, a utilização do software *Franklin* ressaltou que a alteração encontrada no atual estudo é patogênica e pode estar associada diretamente com a causa da condição, visto que os critérios que a circundam corroboram para esse resultado.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar a base genética da deficiência intelectual recorrente na família analisada. A investigação molecular, iniciada pela exclusão da síndrome do X frágil, revelou uma nova variante patogênica no gene *SYP* (c.262C>T; p.Arg88*), identificada por meio de sequenciamento do exoma completo e validada por análises de co-segregação familiar e análise de patogenicidade. Os resultados demonstraram uma correlação entre a variante identificada e o fenótipo clínico observado, que incluiu DI moderada a grave, epilepsia, macrocefalia e distúrbios psiquiátricos. Enquanto a DI e a epilepsia já haviam sido associadas a alterações patogênicas no gene *SYP* em um estudo anterior, a presença de macrocefalia e transtornos psiquiátricos constituiu uma expansão do espectro fenotípico relacionado a este gene. Contudo, é importante a realização de estudos funcionais complementares para melhor compreensão do impacto da variante identificada na proteína.

Ademais, destaca-se a desatenção à saúde por tantos anos da família investigada e a importância do acesso à serviços especializados de genética médica para a elucidação de casos de DI sem diagnóstico, só possível, neste caso, por causa da realização de uma pesquisa científica.

REFERÊNCIAS

- ARTHUR, C. P.; STOWELL, M. H. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. **Structure**, London, v. 15, n. 6, p. 707-714, June 2007.
- BASS, N. et al. Genetic testing in children and adolescents with intellectual disability. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 490-495, 2018.
- BERA, M. et al. Synaptophysin chaperones the assembly of 12 SNAREpins under each ready-release vesicle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 45, p. e2311484120, 2023.
- BIELLIK, R. J.; ORENSTEIN, W. A. Strengthening routine immunization through measles-rubella elimination. **Vaccine**, v. 36, n. 37, p. 5645-5650, 2018.
- BRAND, B. A. et al. The impact of X-chromosome inactivation on phenotypic expression of X-linked neurodevelopmental disorders. **Brain Sciences**, v. 11, n. 7, p. 904, 2021.
- CARDOSO, A. R. et al. Essential genetic findings in neurodevelopmental disorders. **Human Genomics**, v. 13, n. 1, p. 31, 2019.
- CIACCIO C. et al. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. **Ital J Pediatr**. v. 43(1):39. 2017.
- CHIURAZZI, P.; PIROZZI, F. Advances in understanding the genetic basis of intellectual disability. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- CHIURAZZI, P. et al. Genetic analysis of intellectual disability and autism. **Acta Biomedica**, v. 91, n. 13-S, p. e2020003, 2020.
- CLARK, M. M. et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. **NPJ Genomic Medicine**, v. 3, n. 1, p. 16, 2018.
- COE, B. P. et al. Neurodevelopmental disease genes implicated by de novo mutation and copy number variation morbidity. **Nature Genetics**, v. 51, n. 1, p. 106-116, 2019.
- CORTES-MARTÍN, J. et al. 22q11.2 deletion syndrome: a systematic review. **Children**, v. 9, n. 8, p. 1168, 2022.
- CUI, C. et al. Fluorescence in situ hybridization: cell-based genetic diagnostic and research applications. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, p. 89, 2016.
- DAVE, U. et al. A community genetics approach to population screening in India for mental retardation - a model for developing countries. **Annals of Human Biology**, v. 32, n. 2, p. 195-203, 2005.
- D'ÁVILA AJCL. Investigação genômica em pacientes com deficiência intelectual ou atraso global do desenvolvimento assistidos na rede pública de saúde do Estado de Goiás. **Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil, 2022.

DE BOER, E. et al. An MT-TL1 variant identified by whole-exome sequencing in an individual with intellectual disability, epilepsy, and spastic tetraparesis. **European Journal of Human Genetics**, v. 29, n. 9, p. 1359-1368, 2021.

DENNY, L. et al. Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol spectrum disorders. **American Family Physician**, v. 96, n. 8, p. 515-522, 2017.

GENOOX. Análise da variante c.262C>T (p.Arg88*) no gene *SYP*. Franklin, 2025. Disponível em: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/variant/snp/chrX-49050784-G-A?app=acmg-classification>. Acesso em: 17 mar. 2025.

GORDON, S. L. et al. Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 39, p. 14032-14036, 2011.

HADDAD LA, MINGRONI-NETTO RC, VIANNA-MORGANTE AM, PENA SDJ. A PCR based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Hum Genet**, 97:808-812, 1996.

HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J. Fragile X syndrome. **Current Biology**, v. 31, n. 6, p. R273-R275, 2021.

HAN J. et al. Targeted Next-Generation Sequencing of Korean Patients With Developmental Delay and/or Intellectual Disability. **Front Pediat**. V. 6(391), 2018.

HARRIPAUL, R. et al. The use of next-generation sequencing for research and diagnostics for intellectual disability. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, p. a026864, 2017.

INTELLECTUAL DISABILITY. In: OMIM. Baltimore: Johns Hopkins University, 2023. Disponível em: <https://omim.org>. Acesso em: 14 mar. 2025.

JANSEN, S. et al. The genetics of intellectual disability. **Brain Sciences**, v. 13, n. 2, p. 231, 2023.

KAUFMAN, L. et al. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 2, n. 4, p. 182-209, 2010.

LEE, K. et al. Intellectual disability. In: StatPearls. Treasure Island: **StatPearls Publishing**, 2023.

LEITE, A. et al. Diagnostic yield of undiagnosed intellectual disability, global developmental delay, and multiple congenital anomalies using karyotype, microarray analysis, whole-exome sequencing from Central Brazil. **PLoS ONE**, v. 17, n. 4, p. e0266493, 2022.

LIAO, P. et al. Prevalence and incidence of physical health conditions in people with intellectual disability - a systematic review. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0256294, 2021.

MAULIK, P. K. et al. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. **Research in Developmental Disabilities**, v. 32, n. 2, p. 419-436, 2011.

MILA, M. et al. Fragile X syndrome: an overview and update of the FMR1 gene. **Clinical Genetics**, v. 93, n. 2, p. 197-205, 2018.

- MITCHELL, C. D. HIV-1 encephalopathy among perinatally infected children: neuropathogenesis and response to highly active antiretroviral therapy. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 12, n. 3, p. 216-222, 2006.
- NAJMABADI, H. et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 57-63, 2011.
- NERI, G. et al. X-linked intellectual disability update 2017. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 6, p. 1375-1388, 2018.
- Pesquisa Nacional de Saúde (PNS): 2019: Pessoas com Deficiência e as Desigualdades Sociais no Brasil / **IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento**. - Rio de Janeiro: IBGE, 2022.
- POSEY, J. E. et al. Insights into genetics, human biology and disease gleaned from family based genomic studies. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 4, p. 798-812, 2019.
- PROTIĆ, D. et al. Fragile X syndrome: from molecular aspect to clinical treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 1935, 2022.
- QUACH, T. et al. Intellectual disability: dendritic anomalies and emerging genetic perspectives. **Acta Neuropathologica**, v. 141, n. 2, p. 139-158, 2021.
- RAMOS-MIGUEL, A. et al. Frontotemporal dysregulation of the SNARE protein interactome is associated with faster cognitive decline in old age. **Neurobiology of Disease**, v. 114, p. 31-44, 2018.
- REHM, H. et al. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. **EMBO Journal**, v. 5, n. 3, p. 535-541, 1986.
- RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405-424, 2015.
- RODRIGUES, B. et al. Use of the FMR1 gene methylation status to assess the X-chromosome inactivation pattern: a stepwise analysis. **Genes**, v. 13, n. 3, p. 419, 2022.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. R., & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). **Cold Spring Harbor**, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.
- SANTANA, N. A. et al. Alterações genéticas comuns na deficiência intelectual e doenças metabólicas: revisão sistemática. **Revista Foco**, v. 16, n. 9, p. e3152, 2023.
- SITZMANN, A. F. et al. Rare FMR1 gene mutations causing fragile X syndrome: a review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 1, p. 11-18, 2018.
- STRANDE, N. T. et al. Navigating the nuances of clinical sequence variant interpretation in Mendelian disease. **Genetics in Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2022.
- SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle revisited. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 317-320, 2000.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D638-D646, 2023.

TAKAMORI, S. et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 831-846, 2006.

TARPEY, P. S. et al. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nature Genetics**, v. 41, n. 5, p. 535-543, 2009.

TOPPER, S. P.; OBER, C.; DAS, S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. **Clinical Genetics**, v. 80, n. 2, p. 117-126, 2011.

UNIPROT CONSORTIUM. Gene *SYP*. UniProt, 2023. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08247/entry>. Acesso em: 20 mar. 2025.

VISSERS, L. E.; GILISSEN, C.; VELTMAN, J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 9-18, 2016.

WANG, C. et al. Structure and topography of the synaptic V-ATPase-synaptophysin complex. **Nature**, v. 631, n. 8022, p. 899-904, 2024.

WHITE, D. N.; STOWELL, M. H. B. Room for two: the synaptophysin/synaptobrevin complex. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 13, p. 740318, 2021.

WRIGHT, C. F. et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. **The Lancet**, v. 391, n. 10173, p. 1487-1498, 2018.

ZARREI, M. et al. A large data resource of genomic copy number variation across neurodevelopmental disorders. **NPJ Genomic Medicine**, v. 4, n. 26, 2019.