

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



TESE DE DOUTORADO

Aspectos genéticos e fisiológicos envolvendo estresse crônico relacionados a deficiência intelectual e habilidades cognitivas de crianças e adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004.

Karen Yumaira Sánchez Luquez

**Pelotas
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



Aspectos genéticos e fisiológicos envolvendo estresse crônico relacionados a deficiência intelectual e habilidades cognitivas de crianças e adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004.

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas para obtenção do título de Doutor.

Doutoranda: Karen Yumaira Sánchez Luquez
Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Tovo-Rodrigues
Coorientadora: Prof^a. Dra. Simone de Menezes Karam

Pelotas 2023

L926a Luquez, Karen Yumaira Sánchez

Aspectos genéticos e fisiológicos envolvendo estresse crônico relacionados a deficiência intelectual e habilidades cognitivas de crianças e adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004 / Karen Yumaira Sánchez Luquez ; Luciana Tovo-Rodrigues, orientadora ; Simone de Menezes Karam, coorientadora. — Pelotas, 2023.

321 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Epidemiologia. 2. Quociente de inteligência. 3. Interação gene-ambiente. 4. Cortisol capilar. 5. Deficiência intelectual. I. Tovo-Rodrigues, Luciana, orient. II. Karam, Simone de Menezes, coorient. III. Título.

CDD : 614.4

Elaborada por Elionara Giovana Rech CRB: 10/1693

Karen Yumaira Sánchez Luquez

Aspectos genéticos e fisiológicos envolvendo estresse crônico relacionados a deficiência intelectual e habilidades cognitivas de crianças e adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Luciana Tovo-Rodrigues (presidente)

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia – UFPel, RS

Prof. Dra. Simone Menezes Karam (coorientadora)

Faculdade de Medicina – FURG, RS

Prof. Dra. Iná Santos (examinadora interna)

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia – UFPel, RS

Prof. Dr. Fernando Hartwig (examinador interna)

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia – UFPel, RS

Prof. Dra. Lavínia Schuler- Faccini (examinadora externa)

Departamento de Genética – UFRGS, RS

Pelotas, 2023

Mantenha o entusiasmo, pois cada erro nada mais é do que uma oportunidade de começar de novo com mais certeza. Ou não, mas sempre recomeça...

Karen Sánchez

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, minha gratidão à vida por ter me conduzido nesse caminho cheio de encantos.

Obrigada a toda a turma do PPGEpi 2019, pela carinhosa acolhida, parceria, apoio e acompanhamento neste percurso; muito além do âmbito acadêmico. Meu agradecimento aos professores do PPGEpi, dos quais pude aprender mais do que apenas conhecimentos, especialmente às minhas orientadoras e coorientadora, pela oportunidade, aprendizado, confiança e apoio.

Agradeço à minha família, de perto e de longe, por estarem sempre juntos.

E agradeço a cada participante e a toda a equipe da coorte de 2004, por me permitir fazer parte desse projeto.

Por fim, às instituições brasileiras pelo financiamento que apoiou este projeto.

Sempre grata!

RESUMO

Sánchez-Luquez, Karen Yumaira. **Aspectos genéticos e fisiológicos envolvendo estresse crônico relacionados a deficiência intelectual e habilidades cognitivas de crianças e adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004.** Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2023.

Habilidades cognitivas na infância são um importante preditor de saúde, performance educacional e renda na vida adulta. Aproximadamente 1% a 3% das crianças, no mundo todo, apresentam algum tipo de deficiência intelectual, o que configura um importante problema de saúde pública. Sabe-se que problemas neurológicos, como a deficiência intelectual (DI), podem ser causados por fatores ambientais e/ou genéticos. Adicionalmente, crianças com comprometimento neurológico apresentam alterações endócrinas, como no eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), cujo principal efeito é a produção de cortisol. Esta tese se propôs ajudar a elucidar fatores genéticos e fisiológicos associados à DI e à inteligência geral por meio de revisão sistemática da literatura e meta-análise assim como de análises originais em indivíduos participantes da coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004 (N=4.231). A DI na infância caracteriza-se por deficiência em habilidades mentais gerais associadas a um quociente de inteligência (QI) inferior a 2 desvios-padrão da média populacional e limitações adaptativas em vários domínios. A DI é uma condição de etiologia e apresentação clínica heterogêneas. Na atualidade, para o diagnóstico etiológico da DI é sugerido avaliar a presença de variantes genéticas causais do transtorno via sequenciamento de exoma completo ou WES (do inglês - Whole Exome Sequencing). Porém, a maioria dos casos de DI inespecífica continua sem diagnóstico etiológico. Nesta tese, investigamos a taxa de diagnóstico molecular da DI por meio do WES, empregando meta-análise em artigos publicados até 2022. Como resultados, revelamos que o teste WES é responsável por uma taxa de diagnóstico geral de 42% dos casos de DI e que esta taxa é ainda maior quando se incluem amostras de ambos os pais na análise. Além disso, identificamos conjuntos de genes que podem ser considerados como uma proposta de caminhos etiológicos da DI a serem explorados. Com foco maior nas habilidades cognitivas, em um artigo original da tese, objetivamos identificar fatores associados à inteligência (QI) no período do desenvolvimento infantil na coorte de nascimentos de Pelotas de 2004. Sabe-se que a inteligência é uma característica multifatorial que resulta de uma complexa relação entre fatores genéticos e ambientais ao longo do ciclo vital. Assim, buscamos testar a associação de um escore poligênico para o QI e estimulação precoce da criança (ECS), bem como a interação entre eles para modificar o QI aos 6 anos. Ambos os fatores foram associados independentemente ao QI, não tendo sido observada modificação de efeito. Por fim, no último artigo original da tese, testamos a associação entre DI, e concentração de cortisol capilar, obtido aos 15 anos, na mesma coorte. Nossos resultados sugerem que indivíduos com DI possam ter maior concentração de cortisol capilar, principalmente casos caracterizados como idiopáticos, apresentam maior concentração de cortisol capilar quando comparado com crianças neurotípicas. Assim, é possível que indivíduos com DI possam ter problemas no eixo HPA ou resposta ao estresse na adolescência. Esta tese contribui para elucidar fatores genéticos envolvidos na DI, assim como na inteligência geral, e abre novas possibilidades de fatores etiológicos da DI a serem explorados.

Palavras chaves: interação gene-ambiente; estimulação cognitiva e interação social; escores poligênicos; rendimento diagnóstico na DI; fenótipo reverso na DI; cortisol capilar, quociente de inteligência, deficiência intelectual, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

ABSTRACT

Sánchez-Luquez, Karen Yumaira. **Genetic and physiological aspects involving chronic stress related to Intellectual Disability and cognitive abilities of children and adolescents from the 2004 Pelotas Birth Cohort.** Thesis (Doctorate in Epidemiology) - Graduate Program in Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2023.

Cognitive ability in childhood is an important predictor of health, educational performance, and income in adulthood. Approximately 1% to 3% of children worldwide have some form of intellectual disability, which is a major public health problem. Neurological problems such as intellectual disability (ID) are known to be caused by environmental and/or genetic factors. In addition, children with neurological impairment have endocrine alterations, such as in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) neuroendocrine axis, the main effect of which is the production of cortisol. The aim of this thesis was to contribute to the elucidation of genetic and physiological factors associated with ID and general intelligence through a systematic literature review and meta-analysis, as well as original analyses in individuals participating in the 2004 Pelotas Birth Cohort (N=4,231). ID in childhood is characterized by a deficiency in general mental ability, associated with an intelligence quotient (IQ) less than 2 standard deviations from the population mean, and adaptive limitations in various domains. ID is a condition of heterogeneous etiology and clinical presentation. Currently, for the etiologic diagnosis of ID, it is proposed to evaluate the presence of genetic variants causing the disorder by whole exome sequencing (WES). The aim of this thesis was to contribute to the elucidation of genetic and physiological factors associated with ID and general intelligence through a systematic literature review and meta-analysis, as well as original analyses in individuals participating in the 2004 Pelotas Birth Cohort (N=4,231). ID in childhood is characterized by a deficiency in general mental ability, associated with an intelligence quotient (IQ) less than 2 standard deviations from the population mean, and adaptive limitations in various domains. ID is a condition of heterogeneous etiology and clinical presentation. Currently, for the etiologic diagnosis of ID, it is proposed to evaluate the presence of genetic variants causing the disorder by whole exome sequencing (WES). However, most cases of non-specific ID remain undiagnosed. In this thesis, we investigated the rate of molecular diagnosis of ID by WES using a meta-analysis of articles published up to 2022. The results show that the WES test is responsible for an overall diagnostic rate of 42% of ID cases, and that this rate is even higher when samples from both parents are included in the analysis. In addition, we identified sets of genes that could be considered as proposed etiologic pathways of ID to be explored. With a greater focus on cognitive abilities, in an original article in the thesis, we aimed to identify factors associated with intelligence (IQ) in the period of child development in the 2004 Pelotas birth cohort. It is known that intelligence is a multifactorial trait that results from a complex relationship between genetic and environmental factors throughout the life cycle. Therefore, we sought to test the association of a polygenic score for IQ and early child stimulation (ECS), as well as the interaction between them, to modify IQ at 6 years of age. Both factors were independently associated with IQ and no effect modification was observed. Finally, in the last original article of the thesis, we tested the association between ID and hair cortisol concentration, obtained at the age of 15, in the same cohort. Our results suggest that individuals with ID have higher concentrations of capillary cortisol, mainly cases characterized as idiopathic, have a higher concentration of capillary cortisol compared to neurotypical children. Thus, it is possible that individuals with ID may have problems with the HPA axis or the stress response in adolescence. This work contributes to the elucidation of genetic factors involved in ID, as well as general intelligence, and opens up new ways of exploring etiological factors in ID.

Key words: gene-environment interaction; cognitive stimulation and social interaction; polygenic scores; diagnostic yield in ID; reverse phenotype in ID; hair cortisol, intelligence quotient, intellectual disability, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.

SUMÁRIO

Apresentação

- I. Projeto de pesquisa**
- II. Alterações no projeto de pesquisa**
- III. Relatório de trabalho de campo**
- IV. Artigos**
 - Artigo 1**
 - Artigo 2**
 - Artigo 3**
- V. Comunicado à imprensa**

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado foi elaborada pela aluna Karen Sánchez, sob orientação da Profa. Dra. Luciana Tovo Rodrigues e coorientada pela Profa Dra. Simone de Menezes Karam, seguindo as normas regimentais adotadas pelo Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas. Inicialmente é apresentado o projeto de tese, o qual foi defendido em dezembro de 2020, e que se encontra em conformidade com as sugestões propostas pela banca examinadora naquele momento. Logo após, são apresentadas modificações no projeto juntamente com os motivos pelos quais elas foram realizadas. Em seguida, apresenta-se o relatório do acompanhamento dos 15 anos da Coorte de Nascimentos de 2004, realizado em 2020, sobre o qual a autora realizou seu trabalho de campo, obrigatório para o curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia. A seguir, são apresentados os três artigos que compõem a tese de doutorado, no formato requerido pelas revistas às quais foram ou serão submetidos. O primeiro artigo, composto de revisão sistemática e meta-análise, intitula-se “The contribution of whole-exome sequencing to intellectual disability diagnosis and knowledge of underlying molecular mechanisms: A systematic review and meta-analysis.”, e foi publicado na revista “Mutation Research - Reviews in Mutation Research”, em julho de 2022. Os demais são artigos originais que empregam dados da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004. O segundo artigo da tese, “Evaluation of genomic factors and early childhood stimulation on intelligence in children from a Brazilian birth cohort: the primary role of independent factors”, foi submetido à revista “Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry”, em julho de 2023. O terceiro artigo, cujo título é “Association between intellectual disability and hair cortisol concentration in adolescents from a Brazilian population-based birth cohort.”, encontra-se formatado conforme as normas da revista “Psychoneuroendocrinology”. Ao final do volume, está disponível uma nota à imprensa para divulgação da pesquisa à população em geral.

I. PROJETO DE PESQUISA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



PROJETO DE PESQUISA

Aspetos genéticos e fisiológicos envolvidos na deficiência intelectual: identificação de mutações *de novo* por sequenciamento de exoma completo e avaliação de estresse crônico por cortisol capilar

Karen Yumaira Sánchez Luquez

**Pelotas
2020**

KAREN YUMAIRA SÁNCHEZ LUQUEZ

Aspetos genéticos e fisiológicos envolvidos na deficiência intelectual: identificação de mutações *de novo* por sequenciamento de exoma completo e avaliação de estresse crônico por cortisol capilar

Projeto de Pesquisa
apresentado ao programa de
Pós-graduação em
Epidemiologia da
Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial
para obtenção do título de
Doutor em Epidemiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Tovo-Rodrigues
Coorientadora: Prof^a. Dra. Simone de Menezes Karam

Pelotas, 2020

ARTIGOS PLANEJADOS

Artigo 1: Sequenciamento do exoma completo na caracterização e investigação da etiologia da deficiência intelectual: uma revisão sistemática.

Artigo 2: Estudo de sequenciamento de exoma para identificação de mutações *de novo* causais/marcadores de deficiência intelectual em casos idiopáticos da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

Artigo 3: Níveis de cortisol capilar e sua associação com deficiência intelectual em adolescentes de 15 anos de idade da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

Resumo

Aproximadamente 1% a 3% das crianças, no mundo todo, apresentam algum tipo de deficiência intelectual. A deficiência intelectual (DI) é uma condição definida por deficiências no início da infância e por habilidades mentais gerais associadas a um quociente de inteligência inferior a 70 pontos, assim como também por limitações em vários domínios do comportamento adaptativo.

Estudos populacionais que se utilizam de metodologias modernas na investigação de aspectos etiológicos e fatores associados à DI ainda são pouco comuns. Sabe-se que a DI pode ser causada por fatores ambientais e/ou genéticos. O presente projeto se propõe ajudar a elucidar os mecanismos biológicos envolvidos na DI por meio de uma abordagem genética e fisiológica em adolescentes pertencentes a uma coorte de nascimentos.

Esta tese contemplará um estudo de revisão sistemática sobre as estratégias e abordagens de pesquisa para identificar genes/variantes causais no desenvolvimento da DI via uso do sequenciamento de exoma completo (WES). Um segundo estudo visa avaliar treze casos de DI idiopática e seus pais biológicos, pertencentes à Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004, para identificar variantes genéticas de novo via WES-trio, que possam contribuir para o desenvolvimento da DI. Por fim, pretende-se avaliar a associação entre fatores fisiológicos (como o estresse emocional crônico, especificamente os níveis capilares de cortisol) e habilidades cognitivas entre adolescentes da coorte de 2004 com e sem DI.

DEFINIÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Siglas Abreviaturas	Definição
DI	Deficiência Intelectual
WES	Sequenciamento de exoma completo (do inglês - <i>Whole Exome Sequencing</i>)
DNDs	Distúrbios do Neuro Desenvolvimento
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5a edição
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
QI	Quociente de inteligência
WISC-III	do inglês - <i>Wechsler Intelligence Scale for Children-III</i>
WPPSI	do inglês - <i>Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence</i>
TEA	Transtorno do espectro do autista
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
CNVs	Variantes do número de cópias (do inglês - <i>Copy Number Variation</i>)
XL	Ligado ao cromossomo sexual X
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (do inglês - <i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
MLPA	Amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (do inglês - <i>Multiplex Ligation-Dependant Probe Amplification</i>)
QF-PCR	Reação em cadeia da polimerase de fluorescência quantitativa (do inglês - <i>Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction</i>)
CMA	Microarranjos cromossômicos (do inglês - <i>Chromosomal Microarrays</i>)

Siglas Abreviaturas	Definição
WGS	Sequenciamento de genoma inteiro (do inglês - <i>Whole Genome Sequencing</i>)
TGP	Painéis genéticos direcionados (do inglês - <i>targeted gene panels</i>)
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês - <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNVs	Variantes de nucleotídeo único (do inglês - <i>Single nucleotide variants</i>)
SVs	Variantes estruturais (do inglês - <i>Structural variants</i>)
FXS	Síndrome do X frágil (do inglês - <i>Fragile X syndrome</i>)
DNMs	<i>de novo</i> mutations (do inglês - <i>Damaging de novo mutations</i>)
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês - <i>Adrenocorticotropic hormone</i>)
CRH	hormônio liberador de corticotropina (do inglês - <i>Corticotropin-releasing hormone</i>)
AVP	Vasopressina (do inglês - <i>arginine vasopressin</i>)
GATK	do inglês - <i>Genome Analysis Toolkit</i>
CNV	Variação em número de cópias (do inglês - <i>Copy number variation</i>)
OR	do inglês - <i>Odds Ratio</i>
SIB	Comportamento autolesivo crônico (do inglês - <i>Chronic self-injurious behavior</i>)

LISTA DE ITENS DE EXIBIÇÃO

Figura 1. DI dentro da classificação do DSM-5. Fonte: Pedroso et al.....	29
Figura 2. Esquema de um algoritmo proposto para um protocolo de diagnóstico da DI (Pedroso et al. 2019). SXF: a síndrome do X frágil. HLX: A hidrocefalia ligada ao X. EIM: erros inatos do metabolismo. CGH/SNP array: análise cromossômica por micro arranjo. AG: Continua no assessoramento genético.	33
Figura 3. Tipos de mutações. A) mutações sinônimas, não-sinônimas, de parada, pequenas deleções/inserções; B) mutações em sítios de splicing; C) mutações tipo SNPs de novo; D) mutações cromossômicas. Fonte: Este estudo.....	36
Figura 4. Fluxograma da revisão sistemática com os descritores da DI e WES.....	41
Figura 5. Gráficos de caracterização dos 24 artigos originais identificados na revisão. (A) por ano de publicação, (B) por localidade.....	42
Figura 6. Gráfico de caracterização dos 24 artigos segundo o tipo de abordagem no diagnóstico da DI.....	43
Figura 7. Fluxograma da revisão sistematizada com os descritores da DI, estresse e cortisol.....	50
Figura 8. Gráfico acíclico direcionado (DAG) representando as relações causais entre as variáveis envolvidas na possível relação entre os níveis de cortisol e a condição de DI. A seta verde representa caminhos causais entre exposição e desfecho. A seta e variáveis em cor rosa representam possíveis caminhos de confundimento. A cor cinza indica variáveis não medidas, a cor verde indica outros determinantes da exposição e a cor azul indica outros determinantes do desfecho. O diagrama foi construído utilizando o software DAGitty (disponível em http://www.dagitty.net).	68
Tabela 1: Genes envolvidos na etiologia da DI, identificados a partir de variantes patogênicas de novo detectadas por WES (fonte: NCBI, em data:1/08/2020).....	46
Quadro 1. Descrição dos estudos que investigaram o diagnóstico de DI via WES incluídos na revisão sistemática da literatura.....	71
Quadro 2: Genes envolvidos na etiologia da DI achados por trio-WES, por autor e ano de estudo. Processo e pathway (caminho o rota) anotado para cada.....	78
Quadro 3: Descrição dos estudos que investigaram níveis de Cortisol e Neurodesenvolvimento incluídos na revisão sistemática da literatura.....	82

GLOSSÁRIO

Alelo: Formas alternativas de um gene, diferindo em sequência ou função.

Aneuploidia: Mudança do número normal de cromossomos por aumento (trissomia, tetrassomia etc) ou por diminuição (monossomia ou nulissomia).

Carga genética: O conjunto total de alelos deletérios em um genótipo individual.

Cariótipo: O padrão observado de cromossomos nas células de um indivíduo.

Célula Germinativas: Células que dão origem aos gametas.

Consanguíneos: Descendentes de um ancestral comum. Identifica pessoas com parentesco entre elas.

Cromossomo: Estrutura composta por uma molécula de DNA muito longa e proteínas associadas, contendo a informação genética de um organismo.

Cromossomos autossômicos: nos seres humanos, os cromossomos de 1 a 22, excluídos os cromossomos lisossômicos ou sexuais X e Y.

Cromossomos sexuais: Cromossomo que tem um papel na determinação do sexo.

Deleção genética: Perda de uma sequência de DNA.

Distúrbio cromossômico: Uma condição clínica causada por uma constituição cromossômica anormal na qual há uma duplicação, uma perda ou um rearranjo de material cromossômico ou um número diferente do esperado para a espécie.

Distúrbio Genético: Um defeito total ou parcialmente causado por genes.

DNA (Ácido desoxirribonucléico): material genético portador de informação que compreende os genes. Macromolécula composta de uma cadeia de desoxirribonucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster. Cada desoxirribonucleotídeo contém um grupo fosfato, o açúcar de 5 carbonos 2-desoxirribose, e uma base contendo nitrogênio.

Erro inato do metabolismo: Um distúrbio bioquímico geneticamente determinado, no qual um defeito enzimático específico produz um bloqueio metabólico que pode ter consequências fenotípicas.

Éxon: Qualquer trecho não-íntron da sequência codificante de um gene. Ao conjunto de cerca de 170 mil éxons do genoma humano se dá o nome de exoma.

Fenótipo: As manifestações externas, detectáveis, que são determinadas por um genótipo específico e sua interação com o ambiente.

Fisiopatologia: Um defeito em um processo fisiológico devido a uma mutação genética.

Gene: A unidade fundamental física e funcional da hereditariedade, que leva informação de uma geração para a seguinte; um segmento de DNA composto de uma região transcrita e uma sequência regulatória que possibilita a transcrição.

Genoma: A informação genética total que pertence a uma célula ou a um organismo; em particular, a informação codificada e mantida no DNA.

Genótipo: A constituição genética de uma célula individual ou de um organismo. Combinação particular de alelos observada em um indivíduo específico.

Herança complexa: Um padrão de herança que não é mendeliana. Uma característica com herança complexa em geral resulta de alelos em múltiplos loci interagindo entre si e com fatores ambientais.

Heterozigotos: são indivíduos que possuem dois alelos diferentes em um locus específico em um par de cromossomos homólogos (oposto de homozigoto).

Homozigoto: Organismo diploide com dois alelos idênticos de um gene específico (oposto de heterozigoto).

Idiopático: Termo usado na medicina para descrever uma doença ou condição para a qual nenhuma causa conhecida pode ser identificada.

Íntron: Sequências intercalares de bases de DNA dentro de genes eucarióticos e que não são representadas no RNA final transcrito porque foram removidas do transcrito primário do RNA.

Loco ou locus (plural: loci): O local específico de um cromossomo onde está situado um gene.

Micro-arranjo: Uma matriz que consiste em muitos pontos, cada um consistindo em uma sequência de gene que pode ser usada para hibridizar com uma sonda específica ou com o RNA marcado de um indivíduo.

Mutação: Uma mudança no DNA em um determinado locus em um organismo: 1. cromossômica: qualquer tipo de mudança na estrutura ou número de cromossomos. 2. de ponto: uma pequena lesão, geralmente a inserção ou deleção de um único par de bases, também, chamada de SNP pelas siglas em inglês. 3. sentido Trocado: uma mutação que muda um códon específico para um aminoácido codificar outro aminoácido. 4. sem sentido: substituição de um par de nucleotídeos dentro de uma região codificante de proteína que muda um códon para um aminoácido por um códon de término.

Não sindrômico: Um único transtorno sintomático, envolvendo apenas um tipo de tecido.

Poligênico: Quando uma doença é causada pelo efeito de vários genes.

Polimorfismo: Um gene é considerado polimórfico se mais de um alelo ocupar o *locus* desse gene em uma população. Além de ter mais de um alelo em um *locus* específico, cada alelo também deve aparecer na população a uma taxa de em menos 1% para ser, geralmente, considerado polimórfico.

Probando: É o caso índice, o membro afetado da família por meio do qual a família é avaliada.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): Um método *in vitro* para amplificar um segmento específico de DNA que usa dois *primers* que se hibridizam com pontas opostas do segmento em polaridade oposta e, durante ciclos sucessivos, iniciam a replicação exponencial apenas desse segmento.

Sequência flanqueadora: A região de um gene que precede ou sucede a região transcrita.

Traço autossômico: quando um caráter fenotípico é controlado por um gene que está presente em autossomos (cromossomo 1 a 22).

Traço dominante: quando uma característica fenotípica se expressa em um indivíduo mesmo em heterozigose para um alelo específico.

Traço ligado ao X: quando um caráter fenotípico é controlado por um gene que está presente no cromossomo X.

Traço Monogênico: quando uma doença é causada por defeito num único gene de grande efeito.

Traço recessivo: quando uma característica fenotípica se expressa em um indivíduo que é homozigoto para um alelo específico.

Transtornos sindrômicos: uma condição multis sintomática, afetando diferentes tecidos do corpo. por exemplo.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	10
I. PROJETO DE PESQUISA	11
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MARCO TEÓRICO (REVISÃO NÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA)	27
2.1 Medidas de Inteligência e QI.....	27
2.2 Conceito de DI	28
2.3 Apresentação clínica da DI.....	29
2.4 Fatores causais	30
2.5 Diagnóstico da DI.....	32
2.6. Diagnóstico molecular de DI por WES.....	35
2.7 Fatores associados à DI.....	37
2.8 Biologia do estresse crônico.....	37
3 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	39
3.1 Uso do sequenciamento de ex.....	39
oma na investigação da DI.....	39
3.2. Cortisol e associação com DI.....	49
4 JUSTIFICATIVA.....	55
5 OBJETIVOS.....	58
5.1 Objetivo geral.....	58
5.2 Objetivos específicos	58
6 HIPÓTESES.....	59
6.1 Hipótese geral.....	59
6.2 Hipóteses específicas:	59
7 MÉTODOS.....	60
7.1 Revisão sistemática (artigo 1).....	60
7.1.1 Fonte de dados.....	60
7.1.2. Critérios de elegibilidade.....	61
7.2 Estudos Originais	61
7.2.1 Estudo Original 1 (artigo 2).....	62
8 CRONOGRAMA.....	69
9 FINANCIAMENTO	70

10 APÊNDICES	71
11 ANEXOS.....	88
12 REFERÊNCIAS.....	104
ALTERAÇÕES NO PROJETO DE PESQUISA.....	117
III. RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO	119
1. HISTÓRIA BREVE DA COORTE DE NASCIMENTOS DE 2004.....	126
2. ACOMPANHAMENTO DOS 15-16 ANOS (2019/2020).....	127
3. ATIVIDADES ANTERIORES AO TRABALHO DE CAMPO	127
3.1 Recrutamento de pessoal (auxiliares de pesquisa)	129
3.2 Localização dos participantes	130
3.3 Recrutamento de pessoal (entrevistadores e psicólogos)	132
3.4 Treinamentos específicos	133
3.5 Estudo piloto.....	134
4. INSTRUMENTOS DE PESQUISA	135
4.1 REDCap	135
4.2 Questionários	135
4.2.1 Questionários aplicados à mãe ou responsável	135
4.2.2 Testes psicológicos aplicados à mãe ou responsável	138
4.2.3 Questionários aplicados ao(à) adolescente.....	139
4.3 Equipamentos.....	143
4.3.1 Antropometria, pressão arterial e coleta de cabelo.....	143
4.3.2 BodPod	145
4.3.3 DXA	145
4.3.4 Acelerômetro.....	145
5. MANUAIS DE INSTRUÇÃO.....	145
6. TRABALHO DE CAMPO.....	146
6.1 Início do trabalho de campo.....	146
6.2 Logística do trabalho de campo	146
6.2.1 Recepção dos(as) adolescentes.....	146
6.2.2 Entrevistas	148
6.2.3 Psicólogos(as)	148
6.2.4 CANTAB.....	148
6.2.5 Equipamentos.....	149
6.2.6 Acelerometria	150

6.2.7 Encerramento da visita.....	156
6.2.8 Estratégias de busca dos(as) adolescentes	159
7. SUBESTUDO DEFICIÊNCIA INTELECTUAL	160
8. SITUAÇÕES ADVERSAS E ALTERAÇÕES NA CONDUTA.....	161
9. CONTROLE DO ANDAMENTO DO TRABALHO DE CAMPO	162
10. CONTROLE DE QUALIDADE DOS DADOS	162
11. REVERSÃO DE RECUSAS.....	163
12. HISTÓRICO DE COVID-19 NO BRASIL E NO MUNDO.....	163
13. COORTE 2004 E A PANDEMIA DO NOVO CORONAVÍRUS	168
14. OUTRAS CIDADES.....	169
15. GERENCIAMENTO DOS DADOS.....	170
11.1 REDCap	170
11.2 Equipamentos.....	170
11.3 Análise de inconsistências	171
16. EQUIPE.....	171
14.1 Reuniões de trabalho.....	172
14.1.1 Pesquisadores, supervisão e colaboradores	172
14.1.2 Equipe.....	173
14.2 Alterações na equipe no decorrer do trabalho de campo	173
17. ASPECTOS FINANCEIROS	173
18. QUESTÕES ÉTICAS.....	174
19. RESULTADOS PRELIMINARES DO TRABALHO DE CAMPO	174
REFERÊNCIAS	179
Artigo 1	184
Artigo 3	295
V. COMUNICADO À IMPRENSA	319

1 INTRODUÇÃO

Os Distúrbios do Neurodesenvolvimento (DNDs) afetam mais de 3% das crianças no mundo todo (Shashi et al., 2014) e são caracterizados por disfunção cerebral que resulta no comprometimento de um ou mais domínios, incluindo habilidades motoras, aprendizado, cognição, fala e linguagem e desenvolvimento pessoal ou social (Papenhausen et al. 2011). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5a edição (DSM-5), a deficiência intelectual (DI) é um dos DNDs mais graves (American Psychiatric Association 2013). A DI afeta 1 a 3% da população em geral (Maulik et al. 2011). No Brasil, o último Censo Demográfico registrou 2,6 milhões de habitantes referidos com deficiência intelectual (o que corresponde a 1,4% da população) (IBGE, 2010). DI é uma condição com importância médica, educacional e social (Jacobson et al. 2007). A necessidade de iniciativas para prevenir deficiências, incluindo DI, é acentuada em países menos desenvolvidos. No entanto, a prevenção eficaz requer melhores informações sobre os fatores e causas de risco (Durkin et al. 2000). A maioria das evidências sobre a prevalência e a etiologia da DI vem de países de alta renda (Baird e Sadovnick 1985, Arvio e Sillanpää 2003). Os custos diretos e indiretos da DI são estimados em US \$ 52 bilhões por ano nos EUA (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2004).

A DI pode ser causada por fatores ambientais e/ou genéticos. Acredita-se que os fatores genéticos contribuam com até 50% dos casos de DI, principalmente nas condições graves de quociente intelectual (QI) < 50 pontos (Moeschler et al. 2006). A apresentação clínica e a etiologia da DI são altamente heterogêneas (Elmas et al. 2019), fazendo com que as abordagens moleculares utilizadas até agora na rotina sejam pouco eficientes no diagnóstico e, conseqüentemente, no aconselhamento genético. O teste genético clínico padrão para DI inclui cariótipo, micro arranjo, exame molecular para X frágil, gene único, painel genético e / ou teste de DNA mitocondrial (Sun et al., 2015). Os dois primeiros testes examinam o genoma inteiro de um indivíduo com baixa resolução, enquanto os últimos oferecem maior resolução, mas em uma pequena fração do genoma de uma pessoa (Bowling et al., 2017). Contudo, a maioria dos casos de DI inespecífica continua sem diagnóstico etiológico. Métodos modernos disponíveis na área da genética molecular permitem leituras com alto desempenho, geram dados massivos do genoma humano e apresentam um rendimento diagnóstico superior. Neste sentido, o sequenciamento do

exoma completo (WES) tem sido reconhecido como uma ferramenta potencialmente útil para o diagnóstico e possível elucidação das causas genéticas da DI. Na literatura o WES apresenta um rendimento diagnóstico entre 18,5% e 83%. Portanto, o principal objetivo deste estudo é a caracterização do uso dessas metodologias em estudos clínicos, sobretudo a partir de uma abordagem epidemiológica (num contexto populacional), o que é pouco comum, intenção que torna este trabalho vigente e de importância, tanto a nível individual, quanto coletivo.

Numa perspectiva mais fisiológica, estudar fatores associados à condição da DI resulta útil na atualidade, porque permite esclarecer sua fisiopatologia assim como o manejo clínico e epidemiológico destes indivíduos. Considerando que existem evidências de que níveis cronicamente elevados de cortisol, como marcador da atividade do eixo Hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), são um fator comum no início/manutenção da psicopatologia e diminuição do funcionamento cognitivo (Alvarado 2017), pretendemos avaliar possíveis associações entre níveis de cortisol relacionadas ao estresse crônico em adolescentes com DI (e sem DI como grupo de comparação). Aumentar nossa compreensão das maneiras pelas quais a sobrevivência, o crescimento e a aprendizagem estão inter-relacionados é essencial para compreender o papel central do cérebro na interpretação e na regulação das respostas neuroendócrinas a eventos estressantes, já que muito pouco se sabe sobre a atividade do eixo HPA em pessoas com DI.

2 MARCO TEÓRICO (REVISÃO NÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA)

O marco teórico deste projeto tem como objetivo, primeiramente, fazer uma revisão não sistemática da literatura e apresentar um panorama do conhecimento atual de DI e seus aspectos genéticos, assim como dos aspectos fisiológicos do estresse (focado especialmente na relação do cortisol). Logo após, duas revisões sistemáticas da literatura são apresentadas: a primeira tem como objetivo levantar o conhecimento atual sobre o emprego da técnica do WES para identificar genes/variantes causais da DI (Item 3.1) e a segunda apresenta os resultados da busca sistemática, explorando a relação entre níveis de cortisol e DI (Item 3.2).

2.1 Medidas de Inteligência e QI

A inteligência pode ser definida como a capacidade de um indivíduo para raciocínio lógico, compreensão, autoconsciência, aprendizagem, conhecimento emocional, planejamento, criatividade e resolução de problemas (Hagmann-von Arx et al. 2018). Apesar de muitas controvérsias, existem diversas maneiras de medir a inteligência (Moeschler et al. 2006, Braaten e Norman 2006). Uma delas é através de um teste padronizado com uma pontuação de quociente de inteligência (QI) resultante. A pontuação de QI representa um construto de “inteligência” que inclui uma combinação de habilidades de processamento verbal e não verbal, como vocabulário, informações sobre o mundo, raciocínio, memória de curto prazo e velocidade de processamento de informações. Essas habilidades, juntas, são representadas pela pontuação de QI (Braaten e Norman 2006). Geralmente, uma pontuação no teste de QI abaixo de 70 indica déficits no funcionamento intelectual (Kvarnung e Nordgren 2017).

Desde que foi criado, em 1905, por Alfred Binet (Flynn 2013), o teste de QI é considerado o mais estudado, confiável e útil dentre os testes disponíveis para medir habilidades cognitivas específicas (WHO 1998, Braaten e Norman 2006, Moeschler e Shevell 2014). Existem várias escalas psicométricas para avaliar a inteligência, para adultos e para crianças, mas os dois instrumentos mais frequentemente usados são as escalas de Wechsler e Stanford-Binet (American Association on Mental Retardation 2006). O WISC-III (Escala de Inteligência Wechsler para Crianças-III, do inglês - *Wechsler Intelligence Scale for Children-III* -) é a escala mais usada para avaliar a inteligência de crianças e

adolescentes numa faixa etária entre 6 e 17 anos. Ela fornece escores nas escalas verbal, de execução, e escore na escala total, além de incluir muitos tipos de tarefas, oportunizando a observação das dificuldades da criança e de suas habilidades. A Escala de Inteligência Pré-escolar e Primária Wechsler, o terceira Ed., WPPSI-III (do inglês - *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence*) (Wechsler 2003) é usada para avaliar o desenvolvimento neuropsicológico no período escolar inicial das crianças, fornece subtestes e pontuações compostas que representam o funcionamento intelectual verbal e de desempenho dos domínios cognitivos, além de fornecer uma pontuação composta que representa a habilidade intelectual geral da criança.

2.2 Conceito de DI

De acordo com o DSM-V, a DI caracteriza-se por déficits em capacidades mentais genéricas, como raciocínio, solução de problemas, planejamento, pensamento abstrato, juízo, aprendizagem acadêmica e aprendizagem pela experiência (figura 1). Os déficits resultam em prejuízos no funcionamento adaptativo, de modo que o indivíduo não consegue atingir padrões de independência pessoal e responsabilidade social em um ou mais aspectos da vida diária, incluindo comunicação, participação social, funcionamento acadêmico ou profissional e independência pessoal em casa ou na comunidade. De acordo com o QI, considera-se DI um escore aproximadamente de dois desvio-padrão ou mais abaixo da média da população, o que é equivalente a um escore de QI em torno de 70 ou menos (American Psychiatric Association 2013).

A DI é uma condição com implicações importantes em saúde, educação e economia para todas as nações (Tassé et al. 2013). A prevalência de DI é altamente variável, dependendo do país estudado, da idade dos sujeitos e do método de determinação (Kaufman et al. 2010). Milhões de pessoas em todo o mundo têm DI e a prevalência é calculada entre 1 e 3% nos países desenvolvidos (Petterson et al. 2007). No Brasil, um único estudo de base populacional relatado na literatura, foi realizado na Coorte de Nascimento de Pelotas 2004, foco deste projeto, o qual encontrou uma prevalência de 4,5% de DI nesta população (Karam et al. 2015), sendo a etiologia genética a segunda mais frequente na referida população (Karam et al. 2016).

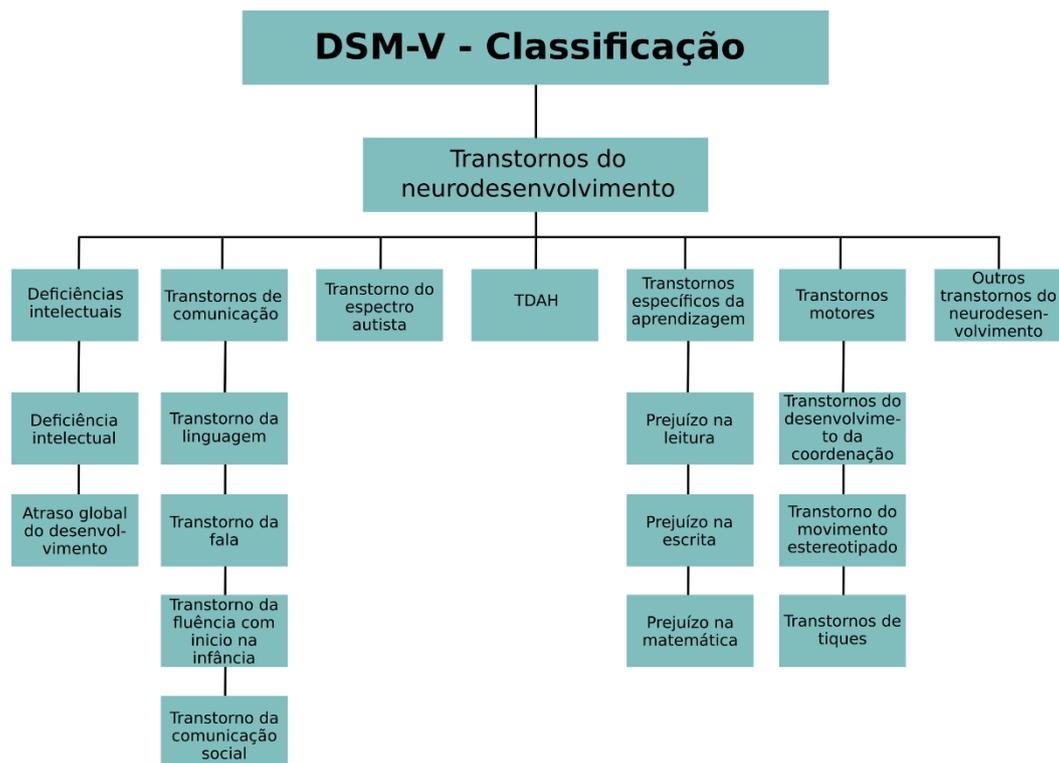


Figura 1. DI dentro da classificação do DSM-5. Fonte: Pedroso et al.

2.3 Apresentação clínica da DI

A apresentação clínica e a etiologia da DI são altamente heterogêneas, resultando em muitos casos de DI não diagnosticados. São critérios necessários para DI seu início antes dos 18 anos de idade, um QI abaixo de 70 e limitações no comportamento adaptativo (Salvador-Carulla et al. 2011).

Os indivíduos com DI podem apresentar uma ou várias das seguintes características: comprometimento acentuado das funções cognitivas necessárias para o desenvolvimento do conhecimento, do raciocínio e da representação simbólica, no nível esperado pelo parceiro, pelo ambiente cultural e pela comunidade; dificuldades de compreensão verbal, raciocínio perceptivo, memória de trabalho e velocidade de processamento; dificuldades em gerenciar comportamento, emoções, relacionamentos interpessoais e dificuldades em manter a motivação no processo de aprendizagem (Salvador-Carulla et al. 2011).

Os vários níveis de gravidade da DI são definidos com base no comportamento adaptativo, e não somente em escores de QI, uma vez que é o funcionamento adaptativo que determina o nível de apoio necessário (American Association on Mental Retardation

2006). Ainda relacionado à heterogeneidade, a DI pode ocorrer isoladamente (forma não sindrômica) ou em combinação com características associadas (forma sindrômica), como malformações congênitas, dismorfias faciais, estatura desproporcional, comprometimento visual/auditivo ou diagnóstico neurológico e neuropsiquiátrico adicional. Os diagnósticos frequentemente coexistentes são transtorno do espectro do autismo (TEA), transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e epilepsia. O espectro de comorbidades indica que podem haver fatores etiológicos subjacentes comuns a DI e a outros distúrbios neurológicos / neuropsiquiátricos (Kvarnung e Nordgren 2017).

Crianças com distúrbios neurológicos e/ou comportamentais podem apresentar respostas neuroendócrinas diferentes em relação às crianças sem comprometimento neurológico (Blomqvist et al. 2007, dos Santos et al. 2012). A adolescência é um período de elevado estresse para muitos jovens e é possível que os desafios da adolescência sejam diferentes para os grupos vulneráveis (King et al. 2019). Por várias razões, que incluem a estigmatização, exclusão e discriminação do sujeito (United Nations Children's Fund 2011), a adolescência pode ser particularmente desafiadora para aqueles com uma deficiência de desenvolvimento (King et al. 2019).

2.4 Fatores causais

A DI é causada por fatores genéticos e ambientais. Uma proporção variável de casos de DI (variando de 17% a 50%) são atribuíveis a causas genéticas (Kaufman et al. 2010, Moeschler e Shevell 2014, Kvarnung e Nordgren 2017). Esta proporção pode variar em função de alguns fatores. Por exemplo, o componente genético é menor nos casos de DI leve comparada com as formas mais graves, assim como em populações com baixas taxas de consanguinidade.

Fatores não genéticos podem prejudicar o desenvolvimento humano durante o período pré, peri ou pós-natal. Entre eles estão infecções maternas durante a gravidez (por exemplo, toxoplasmose, citomegalovírus), substâncias tóxicas (por exemplo, exposição pré-natal ao álcool), deficiências nutricionais (por exemplo, deficiência pré-natal de iodo), asfixia perinatal, complicações da prematuridade (por exemplo, hipoxemia), encefalite e lesões cerebrais traumáticas (Kvarnung e Nordgren 2017). Evidências convergentes de epidemiologia e neurociência também indicam que uma gama de estresses no início da vida, dentre as quais as influências intrauterinas e as deficiências nutricionais, podem

causar anormalidades duradouras na organização e estrutura do cérebro, bem como em processos regulatórios endócrinos, que levam à redução da competência imunológica e níveis de cortisol mais altos ou menos regulados, entre outras consequências (Croen et al. 2001, Wadhwa et al. 2002, Victora et al. 2008).

Nas próximas subseções enfatizaremos os fatores genéticos. Assim, de maneira geral, o componente genético da DI pode ser subdividido em:

1. Componente poligênico: ocorre quando um grande número de genes está envolvido em uma determinada condição, sendo que nenhum deles é necessário ou suficiente para o desenvolvimento do fenótipo (Plomin 1999). É geralmente entendido que muitos casos de DI, especialmente entre os pacientes afetados de maneira mais leve, os quais não seguem um padrão claro de herança mendeliana, resultam da interação entre diferentes genes com fatores ambientais não-genéticos (Corrêa 2002), o que caracteriza a DI como uma condição multifatorial.

2. Aberrações cromossômicas/ variantes do número de cópias (CNVs): incluem anormalidades numéricas dos cromossomos (aneuploidias, poliploidias e monossomias); anormalidades parciais do cromossomo (deleções, inserções, inversões, translocações etc.) e as chamadas deleções e duplicações submicroscópicas que envolvem deleções/duplicações (também conhecidas como CNVs) de apenas um segmento cromossômico limitado (Willemsen e Kleefstra 2014).

3. Defeitos monogênicos: causas monogênicas referem-se a mutações (variantes patogênicas) de grande efeito em um único gene (comumente em regiões codificantes ou regulatórias) que pode afetar de maneira importante a sua função. Estes defeitos se subdividem em:

A) Ligados ao cromossomo sexual X (XL), causados por variantes patogênicas no cromossomo X. Caso o padrão de herança seja recessivo, os homens manifestarão a doença na sua condição de hemizigose. Homozigose do alelo é necessária para manifestação da doença nas mulheres. Se o padrão de herança for dominante, uma única cópia do alelo é suficiente para desencadear a doença, tanto em homens, quanto em mulheres (Winnepenninckx et al. 2003);

B) Autossômicos recessivos, em que os alelos recessivos se apresentam em homozigose, sendo herdados pela transmissão de ambos os genitores não afetados, ou de progenitores

afetados; caso a doença não interfira na capacidade de reprodução do genitor, este poderia transmitir o alelo à sua descendência (Winnepenninckx et al. 2003);

C) Autossômicos dominantes, em que a doença manifesta-se mesmo que o indivíduo seja heterozigoto. Também pode ser originado por uma nova variante patogênica ou provavelmente patogênica (ou mutação *de novo*, explicada com mais detalhe na secção de diagnóstico molecular), responsável pelo acometimento da grande maioria dos casos de DI com uma causa genética identificada (Vissers et al. 2016). Estas variantes são o foco principal de nosso estudo.

Na literatura, de uma forma geral, aproximadamente 20% dos casos de DI são de causa desconhecida ou não são de origem genética e dentre as causas genéticas da DI, a proporção oscila em torno de 29%, se se consideram as CNVs, 11% correspondente às anomalias cromossômicas e 40% às anomalias de origem monogênica. Considerando as últimas, estima-se que, aproximadamente, 31% sejam autossômicas dominantes, 7% ligadas ao cromossomo X e apenas 2% autossômicas recessivas. (Kvarnung e Nordgren 2017).

2.5 Diagnóstico da DI

O diagnóstico de deficiência intelectual baseia-se tanto em avaliação clínica, quanto em testes padronizados das funções adaptativa e intelectual (American Psychiatric Association 2013). Tal diagnóstico não pode ser feito com precisão ou confiabilidade até que a criança atinja pelo menos os 5 anos de idade. Portanto, até alcançar os 5 anos de idade as crianças continuarão com o diagnóstico de atraso no desenvolvimento (Moeschler et al. 2006).

O diagnóstico da DI inclui: (1) exame dismorfológico; (2) exame neurológico; (3) estudos metabólicos; (4) estudos citogenéticos; (5) análise molecular para síndrome do X frágil; (6) estudos neurorradiológicos, dentre outros (van Karnebeek et al. 2005). Na figura 2, é descrito um fluxograma proposto para um protocolo de diagnóstico (Pedroso et al. 2019).

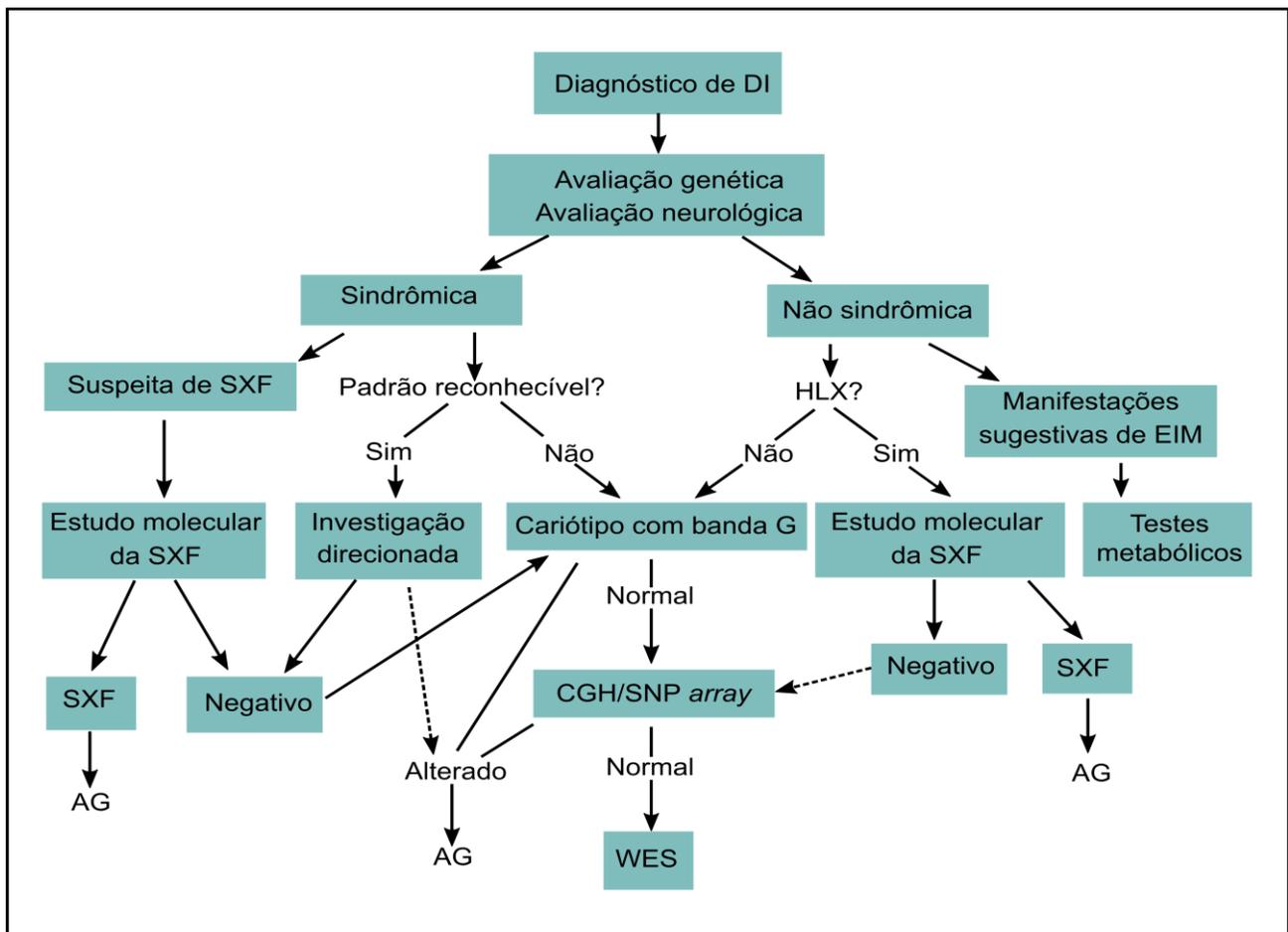


Figura 2. Esquema de um algoritmo proposto para um protocolo de diagnóstico da DI (Pedroso et al. 2019). SXF: a síndrome do X frágil. HLX: A hidrocefalia ligada ao X. EIM: erros inatos do metabolismo. CGH/SNP array: análise cromossômica por micro arranjo. AG: Continua no assessoramento genético.

Apesar da utilização de protocolos de investigação bastante abrangentes, um número significativo de casos não tem a causa identificada (Schwartzman e Lederman 2017). Aproximadamente 30% dos casos graves de DI e 70% dos casos leves de DI permanecem sem um diagnóstico definitivo (González et al. 2013).

A identificação de alterações genéticas responsáveis pelo surgimento de um fenótipo patológico específico permite tratamento e aconselhamento genético adequados. Dentre os métodos tradicionais utilizados até hoje temos, o cariótipo convencional com bandas G (Bayani e Squire 2004) a citogenética Molecular, hibridização fluorescente *in situ*, melhor conhecida como FISH (do inglês - *Fluorescent in situ Hybridization*) (Knight et al. 1997), a técnica Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligaçao ou MLPA (do inglês- *Multiplex Ligation-Dependant Probe Amplification*) (Schouten et al. 2002), a reação em

cadeia da polimerase de fluorescência quantitativa (do inglês- *Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR)) e os microarranjos cromossômicos, (do inglês- *Chromosomal Microarrays* (CMA)), (McMullan et al. 2009), e, por último, os chips comumente utilizados que permitem a genotipagem paralela de 10.000 a mais de 1 milhão de SNPs (Bernardini et al. 2010).

Nos últimos 10 anos, as tecnologias de sequenciamento de nova geração (do inglês- *Next Generation Sequencing*-NGS) têm sido amplamente aplicadas em clínicas de neurologia pediátrica, o que resultou em maior conhecimento a respeito da etiologia genética de DI. O NGS pode ser caracterizado como um sequenciamento automatizado, paralelo e de alto rendimento. Os protocolos de NGS iniciam com o preparo de uma biblioteca, que consiste, resumidamente, na fragmentação do DNA, seguido pela ligação de adaptadores, que são sequências curtas de bases conhecidas, em ambas as extremidades de cada fragmento. Os fragmentos são amplificados por PCR gerando *clusters* de sequências idênticas (Pfeifer e Hainaut 2011).

Atualmente, três abordagens NGS estão em uso: sequenciamento de genoma completo (WGS-*Whole Genome Sequencing*), painéis genéticos direcionados (TGP, do inglês- do inglês *targeted gene panels*) e sequenciamento de exoma completo (WES, do inglês- *Whole Exome Sequencing*) (Han e Lee 2020). Os três desenhos tem sido utilizados na pesquisa diagnóstica da DI (Rabbani et al. 2014). O WGS é o teste de diagnóstico mais abrangente até o momento, uma vez que sequencia todo o genoma. Essa abordagem permite o exame de variantes de nucleotídeo único (SNVs), *indels*, variantes estruturais (SVs) e CNVs (Harripaul et al. 2017). Entretanto, o WGS tem sido muito menos utilizado no diagnóstico da DI quando comparado com TGP e WES (Sun et al. 2015). No TGP, um conjunto customizado de genes presumidamente ligados a uma condição específica de interesse é sequenciado. O TGP tem sido amplamente utilizado na prática do diagnóstico molecular da DI pelo baixo custo e fácil interpretação, quando comparado à outras aplicações de NGS (Grozeva et al. 2015). O WES é uma tecnologia eficiente que examina o exoma completo, onde se acredita que 85% das variantes patogênicas causadoras de doenças ocorram (Choi et al. 2009). Abaixo, faz-se uma descrição mais detalhada do WES no diagnóstico da DI, por ser o foco deste projeto.

2.6. Diagnóstico molecular de DI por WES

O WES é uma ferramenta utilizada no diagnóstico molecular da DI devido a: (1) ser mais barato e analiticamente mais simples do que o WGS; (2) a maioria das variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas causadoras de doenças procuradas é encontrada nas regiões codificadoras de proteínas (Ku et al. 2013).

A técnica de WES permite a identificação de variantes genéticas comuns e raras, incluindo mutações sinônimas, não-sinônimas, de parada, em sítios de *splicing* e pequenas deleções/inserções (Figura 3 A-B) (Teer e Mullikin 2010). Para fins de investigação, estudos de caso-controle utilizam o WES para estabelecer associações entre condições de doenças neurológicas complexas (como casos) e neurotípicos (utilizados como controles). Para fins de diagnóstico, os desenhos de estudo de WES geralmente abrangem três tipos principais: a) em condições síndrômicas, é possível agrupar pacientes numa coorte de indivíduos não relacionados com base em uma coleção compartilhada de fenótipos; (b) em casos familiares recorrentes de DI, a genotipagem de vários indivíduos em uma mesma família pode ser usada para identificar a variante patogênica causadora da doença em regiões genômicas com base em ligação ou mapeamento de homozigosidade (Figura 3 D) (Topper et al. 2011); e (c) em casos não síndrômicos e esporádicos de DI causados por pequenas variantes patogênicas *de novo* de grande efeito (Figura 3C), agindo de forma dominante. Mutações *de novo* são identificadas sequenciando os exomas do paciente e de ambos os pais biológicos e comparando as variantes do paciente com as dos pais.

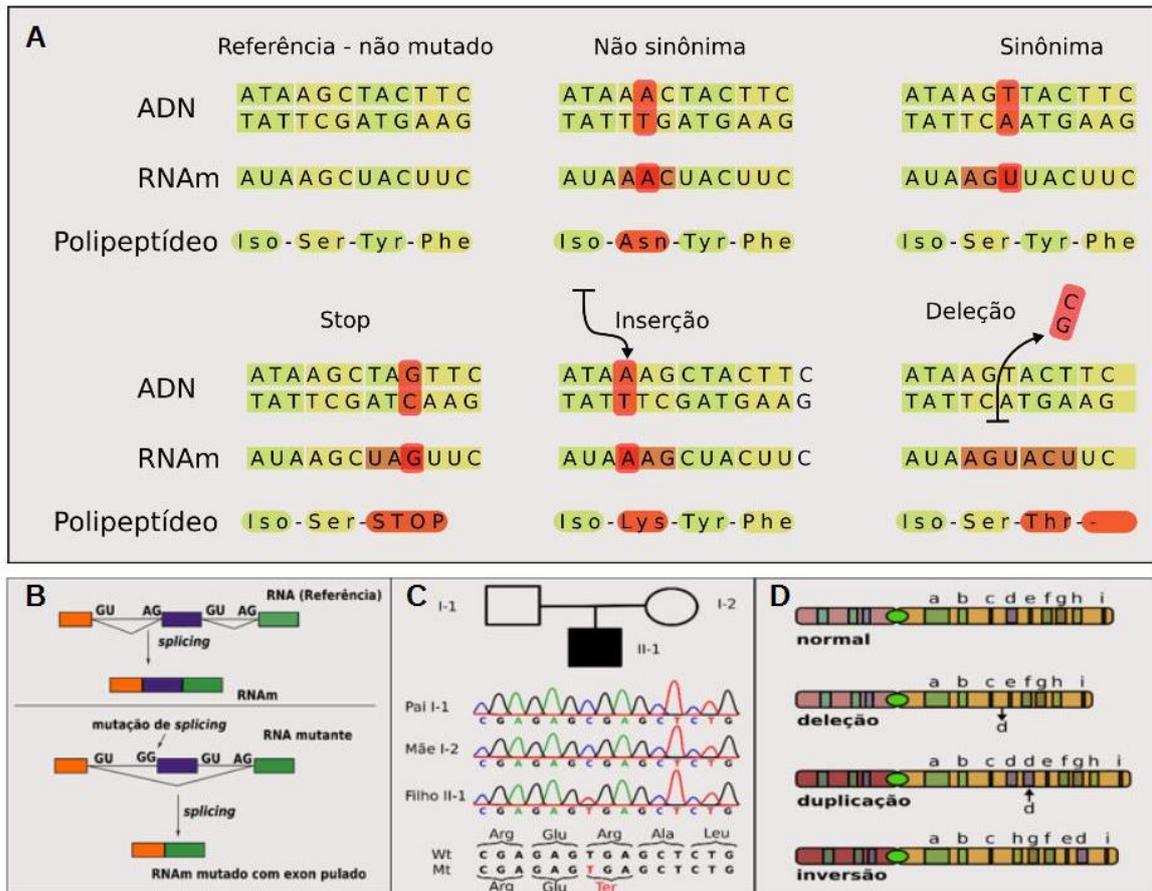


Figura 3. Tipos de mutações. A) mutações sinônimas, não-sinônimas, de parada, pequenas deleções/inserções; B) mutações em sítios de *splicing*; C) mutações tipo SNPs de novo; D) mutações cromossômicas. Fonte: Este estudo.

O WES é especialmente útil no último delineamento. Os DNMs podem variar em tamanho, desde mudança de um nucleotídeo, pequenas inserções/deleções, até grandes (> 50 kbp) deleções, duplicações ou rearranjos genômicos (Wilfert et al. 2017). O WES é geralmente usado em pacientes com testes negativos para o teste de painéis direcionados com fenótipos complexos e sem diagnóstico diferencial óbvio. Porém, recentemente, o WES tem sido cada vez mais aplicado como teste de primeira linha para desordens mendelianas raras e não diagnosticadas (Bamshad et al. 2011, Farwell et al. 2015, Bowdin et al. 2016, Need et al. 2017). Entre os casos de DI testados, de 16 a 39% conseguem ter a causa genética identificada por WES (Rauch et al. 2012, de Ligt et al. 2012). Apesar da existência de testes moleculares eficientes, a etiologia da DI grave, a qual se presume que tenha causas genéticas causais, permanece sem diagnóstico em 61 a 84% dos casos (Gilissen et al. 2014).

Embora de resultados promissores, vários desafios permanecem em relação à implementação dos métodos NGS como ferramentas de diagnóstico no ambiente clínico. Por exemplo, há os que se referem ao desenvolvimento de um *pipeline* e protocolo padronizados desde o experimento até a interpretação dos resultados; também os relacionados à análise de dados, à interpretação dos resultados, ou ainda à comunicação dos resultados aos pacientes e seus famílias e outras preocupações éticas, como a divulgação de achados incidentais (Ku et al. 2013) e a proteção dos dados do paciente. Estes e outros aspectos serão abordados na revisão sistemática da literatura para o WES deste projeto.

2.7 Fatores associados à DI

Numerosos estudos populacionais concentraram-se em exposições não-genéticas específicas como possíveis fatores de risco para DI. Uma revisão sistemática e meta-análise (Huang et al. 2016) sobre o tema incluiu 17 estudos de coorte ou caso-controle, totalizando 55.344 casos e 5.723.749 indivíduos controles elegíveis. Como resultados, dez fatores pré-natais foram identificados: idade materna avançada (acima de 35 anos); filhos de mães de pele preta, com baixa escolaridade, hipertensas, diabéticas, epiléticas ou asmáticas; Ingestão materna de álcool ou tabaco durante a gestação; um fator perinatal (parto prematuro); e dois fatores neonatais (sexo masculino e baixo peso ao nascer) foram significativamente associados ao aumento do risco de DI.

Alguns estudos consideram que doenças mentais tendem a ser agravadas por períodos de estresse (Alvarado, 2017). Um hormônio frequentemente avaliado em pesquisas psiconeuroendócrinas é o cortisol. O cortisol é um hormônio glicocorticoide liberado pelo córtex adrenal através da estimulação do eixo HPA (Marieb e Hoehn 2007). Este eixo exerce um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos. Segue uma breve descrição do funcionamento deste sistema.

2.8 Biologia do estresse crônico

O estresse é definido como a quebra no equilíbrio interno do organismo (ou seja, da homeostase). É um fenômeno complexo, que envolve reações físicas, psicológicas, mentais e hormonais frente às adversidades (Silva e Enumo 2014). Em seres humanos, o

glicocorticoide predominante é o cortisol (Rohleder et al. 2004). Sua secreção está associada ao estresse, pela ativação do eixo HPA (Rohleder et al. 2004).

A concentração plasmática de cortisol é influenciada pelo ciclo circadiano. O sistema circadiano humano normalmente é sincronizado com o dia solar, garantindo vigília durante o dia e sono durante a noite (Silva 2017). Em geral, os níveis de cortisol no sangue aumentam durante o início da manhã (mais alto por volta das 8 horas) e diminuem ligeiramente à noite e durante a fase inicial do sono (Weitzman et al. 1971). Em condições normais, quando uma ameaça ou um desafio é percebido, o eixo HPA é ativado, resultando num aumento do hormônio glicocorticoide cortisol. Esse é sintetizado nas células do córtex das glândulas suprarrenais e controlado pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual é, por sua vez, sintetizado na adeno hipófise. Após o desafio ser resolvido, os níveis de cortisol retornam aos padrões basais; caso sua secreção não se estabilize, o nível de cortisol se torna prejudicial (Hodgson et al. 2004).

O estresse crônico pode ter um impacto sério no organismo pois estimula a produção de altos níveis de hormônios esterídeos liberados pelo sistema endócrino (Edwards 2012, Whirledge e Cidlowski 2013a). Uma quantidade extrema de estresse pode levar a consequências negativas e afetar adversamente os sistemas imunológico, cardiovascular, neuroendócrino e nervoso central. Como se acredita que mais de 70% das doenças estejam relacionadas ao estresse, a prevenção do estresse crônico é um passo importante na redução da incidência de doenças crônicas (Lee et al. 2015).

O estresse crônico tem sido associado à hiperativação do eixo HPA. A atividade do eixo HPA é governada pela secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os quais, ativam a secreção do ACTH pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticoides pelo córtex adrenal (Nemeroff 1996). Os glicocorticoides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa por *feedback* da secreção do ACTH pela pituitária e do CRH a partir do hipotálamo (Jurueña et al. 2004). Em particular, o estresse crônico pode ter um sério impacto devido aos altos níveis produzidos dos produtos químicos liberados, que envolve a liberação de glicocorticoides pelo sistema endócrino (Whirledge e Cidlowski 2013b).

Por muitos anos, só era possível mensurar os níveis de cortisol através de coleta sanguínea, urinária ou salivar. Estas técnicas são invasivas, de alto custo financeiro e necessitam de várias coletas para levar em conta a variação em função do ciclo circadiano (Silva e Enumo 2014). O cortisol capilar emerge como uma técnica alternativa, fornecendo uma medida de estresse crônico vivenciado anteriormente à coleta (Silva e Enumo 2014). Esse método para medir a exposição ao cortisol em humanos foi lançado em 2004 (Raul et al. 2004). Desde então, vários grupos de pesquisa o têm utilizado. Não ser uma técnica invasiva, permitir a padronização da medida e possibilitar aferir a exposição ao estresse crônico são vantagens de analisar o cortisol capilar (Raul et al. 2004). Como o cabelo cresce aproximadamente um centímetro por mês (Wennig 2000), a análise do cabelo oferece a possibilidade de mostrar a atividade média de longo prazo do eixo HPA e de comparar vários segmentos de cabelo, o que corresponde a vários meses juntos de cortisol acumulado, possivelmente incluindo segmentos antes da presença de um evento estressante.

Níveis cronicamente elevados de cortisol, portanto, parecem ser um fator comum no início/ manutenção da psicopatologia e diminuição do funcionamento cognitivo. Estudos sugerem que há aumentos biológicos de estresse durante a adolescência, em resposta a situações de avaliação social (Silva e Enumo 2014). Até agora, poucas pesquisas foram conduzidas sobre a relação entre o cortisol capilar e a DI. Na tentativa de identificar estudos sobre o tema, foi realizada uma revisão sistemática da literatura.

3 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

A seguir são apresentadas duas revisões sistemáticas da literatura, mostrando o estado da arte sobre: 1) uso do WES para ampliar o conhecimento sobre a etiologia da DI e seu potencial como diagnóstico molecular; e 2) associação entre níveis de cortisol e ocorrência de DI.

3.1 Uso do sequenciamento de exoma na investigação da DI

A revisão sistemática da literatura foi realizada com o propósito de atender o objetivo principal do presente projeto de pesquisa, que pretende avaliar a utilidade do WES para identificar variantes genéticas relevantes para DI. Foram utilizadas as bases de dados

indexadas na Pubmed, US National Library of Medicine National Institutes of Health. Todas as referências identificadas na busca foram importadas para o programa Zotero.

Foram incluídos trabalhos originais que produziram dados originais ou utilizaram dados obtidos a partir de WES conduzidos anteriormente, no diagnóstico e/ou investigação da DI (ou “retardo mental”, termo utilizado antigamente) como desfecho principal, realizados em humanos, nos últimos 10 anos, tempo de uso desta metodologia para fins diagnósticos, nos idiomas espanhol, português e inglês. Para complementar a revisão e identificar a viabilidade da redação de um artigo nesta tese, foram incluídos, ainda, artigos de revisão. Foram excluídos trabalhos realizados em pacientes com síndromes específicas, relatos de casos ou séries de casos, cujo tamanho amostral total fosse inferior a 10 indivíduos, artigos baseados em genes-candidatos, artigos *in silico* que visam avaliar a função de variantes genéticas, cartas a editor, comentários e resumos de congresso.

A revisão foi realizada utilizando a seguinte combinação de termos de busca:

"Intellectual disability" [All Fields] OR "mental retardation"[All Fields] AND "whole exome sequencing" AND ("genetics"[Subheading] OR "genetics"[All Fields] OR "genetics"[MeSH Terms] NOT ("syndrome"[MeSH Terms] OR "syndrome"[All Fields]) NOT "neurodevelopment" [All Fields] NOT ("case reports"[Publication Type] OR "case report"[All Fields]).

O processo de busca e seleção de artigos é mostrado na Figura 4. A busca inicial identificou 202 artigos. Após a leitura dos títulos, 7 artigos foram excluídos por não serem relacionados à temática do projeto. Com base na leitura dos resumos, foram excluídos 92 artigos, permanecendo 103 elegíveis para leitura na íntegra, dos quais 28 foram selecionados. Dentro desses 28 artigos, as referências foram revisadas para identificar possíveis estudos não identificados na revisão. Após esse processo, 8 artigos adicionais elegíveis foram encontrados, totalizando 36 artigos incluídos na revisão. Destes, 24 são artigos originais e 12 são artigos de revisão.

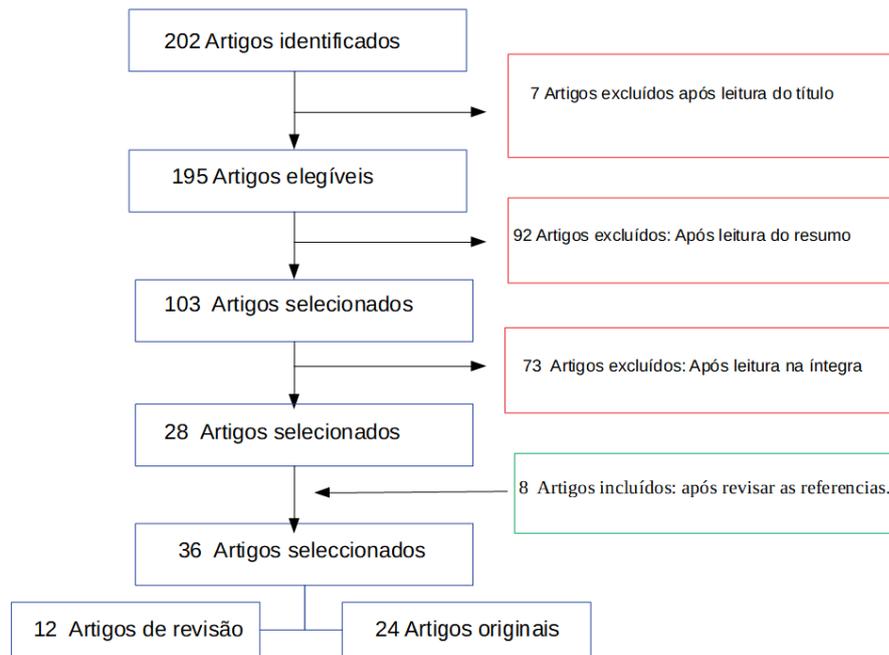


Figura 4. Fluxograma da revisão sistemática com os descritores da DI e WES.

O quadro 1 apresenta os resumos dos achados da revisão sistemática, por autor (apêndice 1). Do total de 36 artigos incluídos, a maioria foi produzida nos últimos 5 anos, especificamente 75% dos artigos originais (figura 5a). Os 24 artigos originais foram realizados principalmente em países Europeus e Asiáticos (n=11; 45.8% e n=8; 33.3%, respectivamente) (figura 5b).

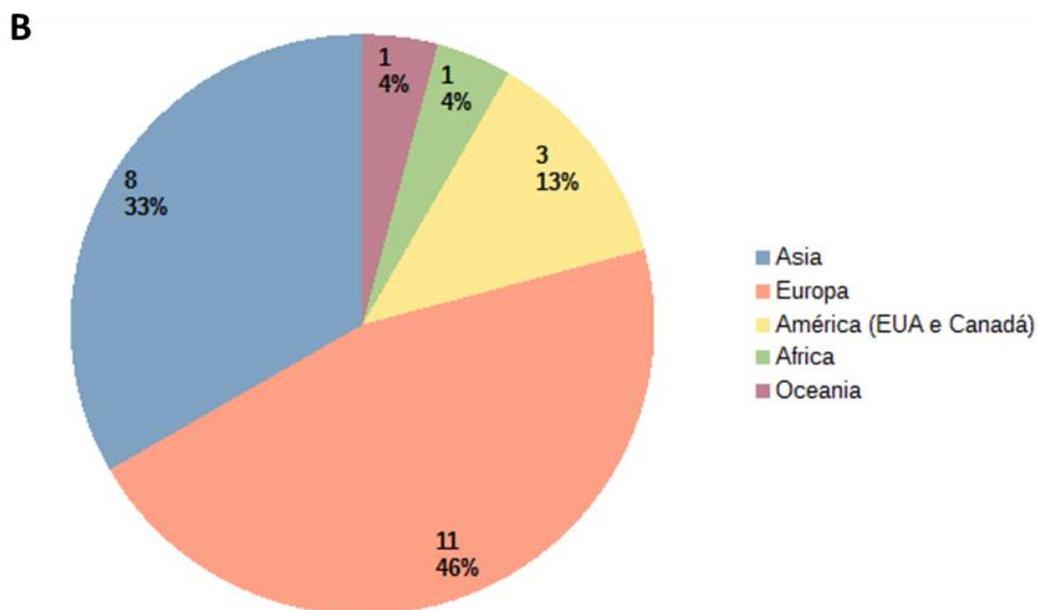
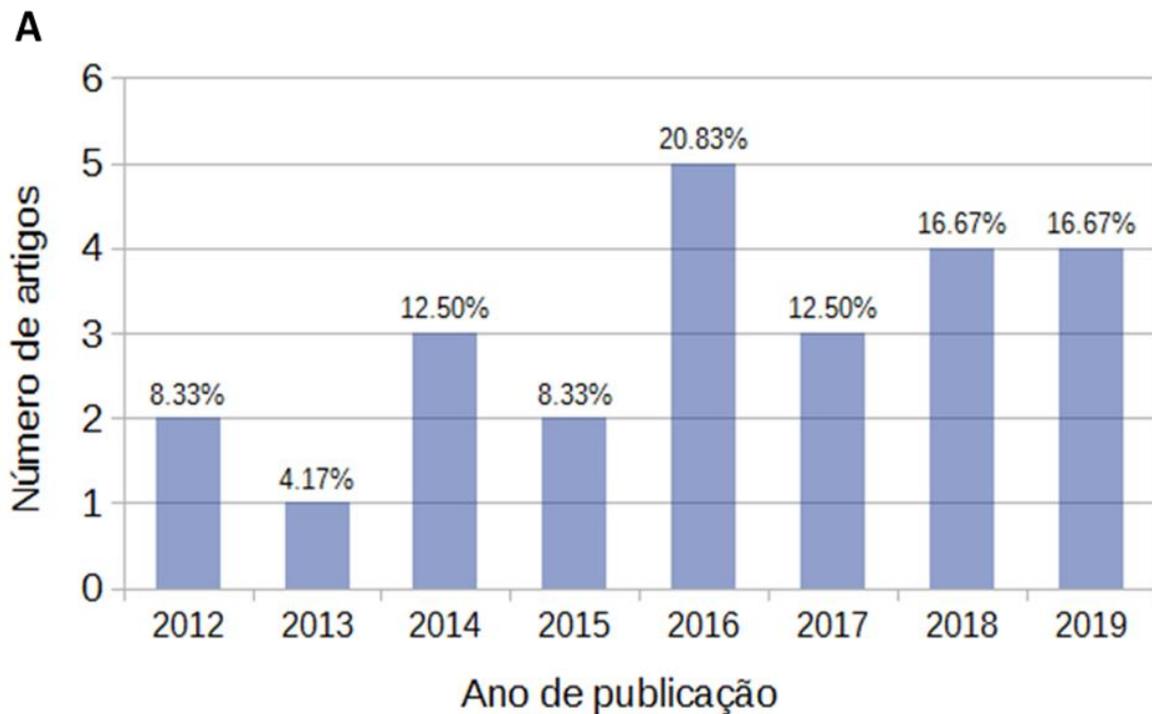


Figura 5. Gráficos de caracterização dos 24 artigos originais identificados na revisão. (A) por ano de publicação, (B) por localidade.

Quanto ao tamanho amostral dos estudos, houve variação de 17 a 4293 indivíduos, com mediana de 64. Onze dos 24 estudos incluíram entre 17 e 50 indivíduos ou probandos; 11 estudos englobaram de 50 a 1000 indivíduos e apenas dois estudos superaram os 1000 indivíduos. Todos os artigos incluem ambos os sexos com exceção de um, o qual apenas inclui meninas adolescentes (Fieremans et al. 2016). A idade dos indivíduos incluídos nos estudos foi, muitas vezes, difícil de identificar. Para 10 estudos não foi possível obter esse

dado. Em apenas dois estudos, a idade em que foi feito o diagnóstico (ao momento da realização do estudo) foi reportada e, em 12 artigos, algum dado é apresentado, ora como uma variável numérica, ora como categórica, o que dificulta a classificação dos indivíduos incluídos nos estudos. Em sua maioria, os artigos incluem participantes de todas as idades, o que, além de gerar muita heterogeneidade, resulta em avaliações de momentos diferentes da evolução do desfecho, o que poderia interferir na interpretação dos resultados.

Quanto à classificação da DI, apenas sete artigos relatam ter utilizado um teste padronizado para a avaliação do QI. Outros nove artigos referem a utilização de avaliações de marcos do desenvolvimento e de habilidades adaptativas, bem como desempenho em tarefas cognitivas. Cinco artigos estudaram condições graves de DI e três trabalhos não especificam os critérios utilizados. Nove dos 24 estudos relatam ter uma rotina prévia negativa de diagnóstico, destacando a importância do WES no diagnóstico da DI idiopática com suspeita de condição genética subjacente. Apenas três relataram o uso do WES como ferramenta nas primeiras tentativas diagnósticas e os outros nada reportam, mas pelo fato de estar à procura de uma causa genética da DI, podemos inferir que não tinham diagnóstico prévio.

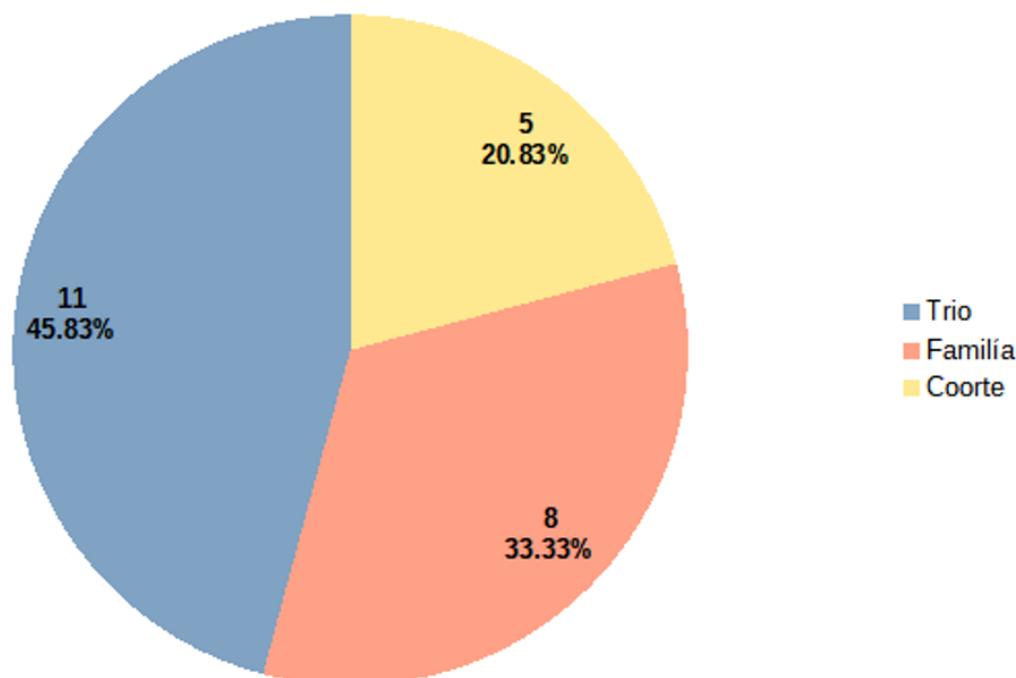


Figura 6. Gráfico de caracterização dos 24 artigos segundo o tipo de abordagem no diagnóstico da DI.

Quanto ao uso de WES para diagnóstico da DI, de uma forma geral, os trabalhos podem ser agrupados em três tipos principais (figura 6). A análise de trios foi o desenho mais frequente, em 45,8% (11/24) dos estudos; seguido por estudos de famílias, utilizado em 29,2% (8/24); seguido de estudos de coorte, que representam 25% (5/24). Esta é uma classificação aproximada dos estudos, na tentativa de caracterizar a literatura. Porém, alguns estudos utilizam mais de uma abordagem, como, por exemplo, os estudos de famílias mistas, que incluem famílias multiplex (mais de um filho afetado e seus pais) e os casos de famílias simples (um filho afetado e seus pais) sendo uma abordagem de sequenciamento de trio (Ohba et al. 2013a, Willemsen e Kleefstra 2014). As características de cada delineamento são abordadas nos parágrafos seguintes, começando pelos estudos com maior taxa diagnóstica e continuando de forma decrescente.

Os estudos de coorte reportaram taxas de diagnóstico, que refere à identificação de uma causa genética, entre 18,5% e 83,3%. Os estudos de coortes para fins de diagnóstico molecular via WES incluem indivíduos não relacionados, agrupados por apresentarem algumas características em comum. Para exemplificar este tipo de abordagem, descrevemos mais detalhadamente o estudo com maior taxa diagnóstica. No estudo de Elmas e colaboradores, (2018) foram selecionados 24 pacientes menores de 16 anos que apresentavam DI e/ou retardo neuromotor; ou, pré-diagnóstico de uma síndrome autossômica recessiva (em caso de casamento consanguíneo entre os pais); ou ter múltiplas anomalias congênitas. Neste estudo, a taxa de diagnóstico foi de 83,3%. Como um dos resultados deste estudo, uma nova variante patogênica (p.Leu351Pro) em homozigose foi detectada no gene *COG5* (OMIM:613612), a qual foi caracterizada como patogênica em análises *in silico* (Elmas et al. 2018). Dentre os outros estudos de coorte, as taxas de diagnóstico foram menores: 18,5% (n= 442) (Kurki et al. 2019); 32,5% (n= 43) (Thevenon et al. 2016); 41,0% (n= 78) (Srivastava e Schwartz 2014); 52,60% (n= 19) (Fieremans et al. 2016). Mais detalhes destes estudos são apresentados no quadro 1 do apêndice.

Os estudos de famílias geralmente se constituem de famílias com mais de um membro afetado, o que reforça a suspeita de um componente genético. Esta abordagem é especialmente útil na descoberta de traços recessivos. Nos estudos de famílias, a taxa de diagnóstico foi maior do que 39%. O estudo que apresentou a maior taxa de diagnóstico (80%) foi realizado em 20 famílias com DI cujas características variavam de dismorfias faciais leves e anormalidades nos testes bioquímicos a manifestações graves como

convulsões intratáveis e malformações intracranianas (Kvarnung et al. 2018). Para ilustrar o uso do WES em conjunto com outras metodologias diagnósticas, Harripaul e colaboradores (2018) utilizaram a genotipagem combinada com *microarray*, mapeamento de homozigose por descendência, identificação de CNV e WES, possibilitando identificar variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 51% de 192 famílias consanguíneas com DI não síndrômica. Como resultado, foram identificados 72 genes diferentes, incluindo 26 não relatados anteriormente para DI autossômica recessiva. Dois novos genes para DI autossômica com mutações sem sentido foram o *BDNF* (fator neurotrófico derivado do cérebro: codifica um membro da família de proteínas do fator de crescimento do nervo) e o *TET1* (tet metilcitosina dioxigenase 1: codifica uma desmetilase que pertence à família TET (translocação dez-onze)) associadas com DI (Harripaul et al. 2018). Dentre os outros estudos de famílias, as taxas de diagnóstico foram menores: 36,8% (n=152) (Reuter et al. 2017); 39,1% (n=25) (Ohba et al. 2013b); 47,6% (n=21) (McSherry et al. 2018); 50% (n=18) (Megahed et al. 2016); 54,2% (n=404) (Hu et al. 2019); 73,4% (n=143) (Alazami et al. 2015). Mais detalhes destes estudos são apresentados no quadro 1 do apêndice.

Um rendimento diagnóstico menor é observado nos estudos trio-WES quando comparados aos estudos de coorte ou família. Em 2010, Lisenka Vissers e colaboradores demonstraram que o WES pode ser utilizado para detectar mutações *de novo* em casos esporádicos de DI não síndrômica e que este tipo de mutação é uma causa comum de DI. Outros estudos (Ng et al. 2009, Vissers et al. 2010) mostraram que existem mais mutações *de novo* em pacientes com DI do que em controles normais, reafirmando a importância destas mutações. A partir dessas evidências, o WES passou a ser usado por pesquisadores no mundo todo, com o objetivo de elucidar a etiologia do fenótipo de pacientes com DI idiopática (Vissers et al. 2010, Hamdan et al. 2014). Em 2012, dois estudos trio-WES confirmaram a importância de variantes patogênicas *de novo* em pacientes com DI: nestes estudos, 51 (Rauch et al. 2012) e 100 (de Ligt et al. 2012) pacientes com DI grave idiopática, juntamente com seus pais não afetados, tiveram seu exoma sequenciado. Como resultado, foi possível identificar que variantes patogênicas *de novo* em genes já associados a DI explicam de 13 a 35% dos casos graves desse fenótipo. Shang e colaboradores realizaram WES em 970 probandos com DI, detectando 4 crianças via trio-WES com variantes patogênicas *de novo* no gene *ARID2* (membros da família gênica ARID têm papéis na padronização embrionária, regulação do gene da linhagem celular, controle do ciclo celular, regulação da transcrição e modificação da estrutura da cromatina), sendo o primeiro relato

do gene na etiologia da DI (Shang et al. 2015). Dentre os outros estudos de trio-WES (n= número de trios analisados no estudo), as taxas de diagnóstico variaram de 25 a 61%: Mcrae e col. 2017, 25% (n= 4293) (Deciphering Developmental Disorders Study 2017); 25 % (n= 66) (Snoeijen-Schouwenaars et al. 2018); 29% (n= 41) (Hamdan et al. 2014); 29% (n= 38) (Rump et al. 2016); 29.4% (n= 17) (Monroe et al. 2016); 35.00% (n= 44) (Tan et al. 2017) ; 42.5% (n= 42) (Willemsen e Kleefstra 2014); 61.00% (n= 100) (Kahrizi et al. 2019). Mais detalhes destes estudos são apresentados no quadro 1 do apêndice.

Além do benefício para fins diagnósticos, o WES tem sido utilizado em estudos populacionais de forma crescente, o que tem permitido a identificação de genes envolvidos na etiologia da DI. A Tabela 1 apresenta, de forma resumida, genes com envolvimento em processos neurobiológicos já descritos em bases de dados de anotação gênica a partir da identificação de variantes patogênicas *de novo* (para detalhes ver quadro 2 no apêndice).

Tabela 1: Genes envolvidos na etiologia da DI, identificados a partir de variantes patogênicas *de novo* detectadas por WES (fonte: NCBI, em data:1/08/2020).

Gene	Processo neurobiológico associado
<i>KIF5C</i>	Transporte de proteína axonal anterógrado, transporte dendrítico anterógrado do complexo receptor de neurotransmissor, orientação do axônio, orientação do axônio do neurônio motor, transporte da vesícula sináptica
<i>MTF1</i>	Desenvolvimento do sistema nervoso central
<i>MYT1L</i>	Desenvolvimento de neurônios, diferenciação de neurônios, compromisso de destino de neurônios, especificação de destino de neurônios
<i>ADNP</i>	Regulação negativa do processo apoptótico do neurônio, regulação negativa da transmissão sináptica
<i>SMARCB1</i>	Desenvolvimento do sistema nervoso
<i>SET</i>	Regulação negativa do processo apoptótico de neurônios
<i>SCN1A</i>	Potencial de ação neuronal, propagação do potencial de ação neuronal
<i>CASK</i>	Secreção de neurotransmissor, regulação da exocitose da vesícula sináptica
<i>CACNA1A</i>	Transmissão sináptica química, modulação da transmissão sináptica química
<i>STXBP1</i>	Depressão sináptica de longo prazo, regulação negativa do processo apoptótico do neurônio, regulação negativa da transmissão sináptica, GABAérgica, transmissão sináptica neuromuscular, secreção de neurotransmissor, neurotransmissão
<i>SCN8A</i>	Mielinização, desenvolvimento do sistema nervoso, potencial de ação neuronal, desenvolvimento do sistema nervoso periférico
<i>FOXP1</i>	Desenvolvimento do cérebro, regulação positiva da diferenciação neuronal
<i>SLC6A1</i>	Organização de sinapses

<i>NEXMIF</i>	Regulação negativa da migração de neurônios
<i>PURA</i>	Desenvolvimento do sistema nervoso
<i>NIPBL</i>	Desenvolvimento do cérebro
<i>ANKRD1</i>	Regulação positiva do desenvolvimento da projeção de neurônios
<i>EP300</i>	Aprendizagem ou memória
<i>ARID1A</i>	Desenvolvimento do prosencéfalo, fechamento do tubo neural
<i>GRIN1</i>	desenvolvimento cerebral
<i>ARID1B</i>	Transmissão sináptica neurônio-neurônio

Considerando a técnica de análise molecular de WES empregada nos estudos, as plataformas mais utilizadas foram HiSeq System (Illumina, Inc.) e SOLiD™ System. Diferenças nos protocolos usados nos diferentes estudos representam mais uma possível fonte de variabilidade nas taxas de diagnóstico por WES. As diferentes taxas podem ser justificadas por motivos como: 1. diferenças nas taxas de erros de incorporação de nucleotídeo entre as diferentes abordagens (Fedurco et al. 2006, McKernan et al. 2008, Shendure e Ji 2008); 2. diferenças na seleção da região alvo do DNA, o que vem determinado pelos *kits*, o que adicionalmente é um limitante na comparabilidade dos resultados (Sampson et al. 2011); 3. diferenças no fluxo de trabalho no processo de chamada das mutações/variantes, o que gera resultados diferentes, inclusive, partindo dos mesmos dados brutos. O fluxo de trabalho mais comum nos estudos desta revisão foi Genome Analysis Toolkit (GATK) (42%). Dessa forma, esses aspectos técnicos devem ser levados em conta no momento de interpretar os resultados derivado do WES.

Após a leitura crítica dos estudos incluídos nesta revisão, podemos citar como vantagens do WES comparado a outros exames genéticos usados convencionalmente no diagnóstico da DI: velocidade no diagnóstico (2-8 dias), englobando a totalidade de região codificante do genoma; precisão no diagnóstico; diagnóstico livre de hipótese *a priori*, não havendo escolha de genes ou painéis específicos; possibilidade de reanálise e reinterpretção dos dados em bases de dados com constante atualização, caso emergjam novos achados clínicos ou científicos; análise de achados incidentais, com indicação de risco futuro de outras doenças não relacionadas ao fenótipo, mas de relevância clínica.

É importante salientar, contudo, que o WES possui limitações e desafios passíveis de aprimoramento, que podem comprometer os resultados obtidos e dificultar a análise e interpretação dos dados. Exemplos de tais limitações são a falta de uniformidade na

cobertura, regiões não-capturadas do exoma e diferenças na eficiência de captura a depender da existência de polimorfismos em regiões de hibridação das sondas.

No cenário do diagnóstico clínico, há uma série de questões relacionadas à tradução desta tecnologia na prática clínica. Dentre os principais desafios ainda se mantêm a interpretação das inúmeras variantes genéticas detectadas, e o continuado aumento nas atualizações das plataformas comerciais. Neste sentido, a terceirização dos serviços de diagnóstico surge como uma boa possibilidade de utilizar novas tecnologias, contando com a redação de laudos técnicos feitos por pessoas qualificadas, o que se traduz numa informação mais simples de entender pelo clínico e pelo paciente.

Como foi identificado um número importante de revisões sistemáticas em nossa busca, incluímos esses artigos de revisão para avaliar sua validade na atualidade. Como resultado, 12 são revisões da literatura, oito são focados especificamente na DI e quatro incluíram, além da DI, outros DNDs, o que fornece uma visão mais ampla do contexto do neurodesenvolvimento.

Em 2010, uma revisão sistemática das causas genéticas de casos de DI não síndrômica lista apenas 47 genes envolvidos nesta condição (Kaufman et al. 2010). Um ano mais tarde, a literatura reportava 6 estudos sobre DI utilizando WES (Topper et al. 2011). A importância das mutações *de novo* em doenças do neurodesenvolvimento, incluindo DI, autismo e esquizofrenia, iniciava a ser sustentada pela literatura no ano de 2013 (Veltman e Brunner 2012, Ku et al. 2013). O progresso do WES como ferramenta utilizada na neuropsiquiatria e suas possíveis limitações já era objeto de estudo no ano de 2015 (Heinzen et al. 2015), quando mais de 700 genes já tinham sido identificados em estudos de doenças autossômicas dominantes ligadas ao X, DI autossômica recessiva e desordens relacionadas, o que permitiu salientar a complexidade clínica e genética reportada da DI (Vissers et al. 2016). No ano de 2016, estudos de WES tiveram importante contribuição no estabelecimento de possíveis mecanismos etiológicos moleculares envolvidos na DI autossômica não síndrômica (Khan et al. 2016). Em 2017, os esforços de pesquisa em andamento para identificar novos genes de doenças, bem como estratégias e abordagens no nível clínico, revelaram mais do que o dobro do número de estudos publicados relacionando a cobertura de NGS na DI (Harripaul et al. 2017). Isto evidenciou a crescente necessidade de integrar e interpretar esses resultados.

O artigo de revisão mais recente sobre resultados obtidos por WES na DI encontrado na busca realizada inclui trabalhos publicados até o mês de agosto do ano de 2016. Outros artigos de revisão foram identificados e incluídos no nosso trabalho, mas esses não tratam diretamente do papel do WES na DI. Considerando o rápido crescimento da literatura neste tema nos últimos anos, os artigos de revisão disponíveis no momento estão possivelmente defasados.

Em resumo, nos estudos incluídos nesta revisão, o uso de WES no diagnóstico da DI abrange os três tipos principais de abordagens (figura 6). Em todos os casos, a taxa de diagnóstico genético da DI pode ser considerada como boa/alta (de 18,5% a 83%), se se leva em conta a grande heterogeneidade fenotípica dessa condição. O que conseqüentemente se traduz na identificação de um grande número de novos genes e/ou genes candidatos envolvidos na etiologia da DI. Considerando que a DI é uma condição com etiologia genética complexa e ainda bastante desconhecida, avanços e melhoras nas taxas de detecção nos métodos diagnósticos podem possibilitar a descoberta de novos genes envolvidos na sua etiologia. Uma atualização constante da literatura é necessária para resumir os achados mais recentes, assim como discutir suas implicações, pois, como se disse, as bases de dados estão em constante atualização, mesmo em outras condições que têm demonstrado uma herança compartilhada com a DI, o autismo e a esquizofrenia. Assim, dado o número crescente de estudos com resultados positivos no diagnóstico, uma atualização da literatura se faz necessária, abrindo a possibilidade de investigar e propor novos mecanismos genéticos envolvidos na DI.

3.2. Cortisol e associação com DI

Esta revisão sistemática da literatura foi realizada com o propósito de atender a um dos objetivos do presente projeto de pesquisa, que pretende avaliar os níveis de cortisol capilar e DI. Foram utilizadas as bases de dados indexadas na Pubmed, US National Library of Medicine National Institutes of Health. Todas as referências identificadas na busca foram importadas para o programa Zotero.

Os critérios de inclusão foram: trabalhos que produziram dados originais dos níveis de cortisol a partir de amostras biológicas, em indivíduos que apresentam algum tipo de atraso no neurodesenvolvimento, DI ou atraso global do desenvolvimento e indivíduos neuróticos, para fins de comparação, realizados em humanos, nos últimos 10 anos, nos

idiomas espanhol, português e inglês. Foram excluídos trabalhos realizados em pacientes com síndromes específicas e relatos de casos ou séries de casos, cartas a editor, comentários e resumos de congresso e trabalhos de revisão.

A revisão foi realizada utilizando a seguinte combinação de termos de busca:

(((cortisol) OR (Stress)) AND ((child development delay) OR (Intellectual disability) OR (mental retardation))) NOT syndrome NOT case-report

O processo de busca e seleção de artigos é mostrado na Figura 7. Como resultado, 2150 artigos foram identificados. Após a leitura dos títulos, 1700 artigos foram excluídos por não serem relacionados a temática em estudo. Após a leitura do resumo, 267 artigos foram excluídos, restando 183 para leitura na íntegra. Em apenas 11 desses, os níveis de cortisol foram medidos e sua relação com algum transtorno de desenvolvimento (incluindo a DI) foi avaliada. Os principais achados desses estudos são apresentados no quadro do apêndice 3. As listas de referências destes 11 artigos foram revisadas para complementar a busca, mas não foram detectados artigos adicionais.

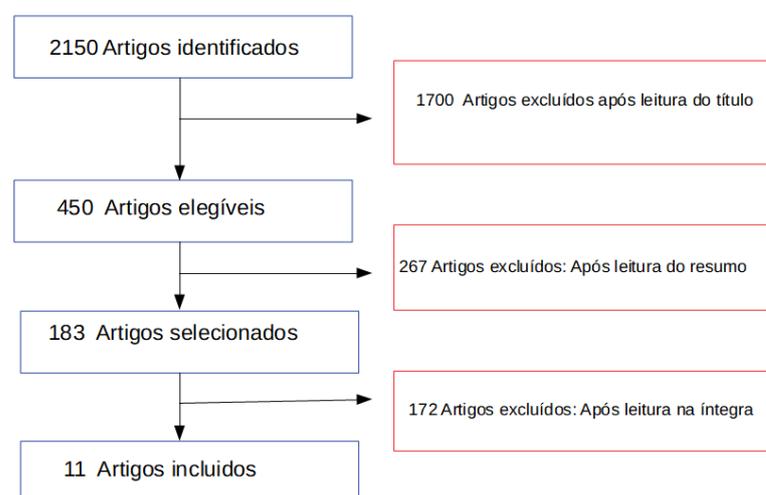


Figura 7. Fluxograma da revisão sistemática com os descritores da DI, estresse e cortisol.

Quanto ao tamanho amostral, os estudos variaram entre 16 e 832, com uma mediana de 115. Quanto ao tipo de estudo, cinco são coortes prospectivas, dois são subamostras

de coortes de nascimento de base populacional, um é uma subamostra de uma coorte de nascimento, dois são transversais com grupo de comparação e um transversal sem grupo de comparação. Quatro estudos são originários de população norte-americana e sete europeia.

No que tange a amostra biológica, dois estudos coletaram amostras de saliva em adultos, três estudos coletaram saliva nas díades mãe-filho, dois apenas em crianças e dois apenas saliva materna. Em um outro estudo a amostra foi sangue materno e noutro, amostra de sangue e fluído amniótico da gestante. O sistema de detecção do cortisol utilizado em cinco estudos foi o imunoensaio enzimático. Outros dois estudos detectaram o cortisol por radioimunoensaio, e ainda outros dois usaram imunoensaio por competição de luminescência. A cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a espectrometria de massa em tandem foi empregada em um dos trabalhos e um outro utilizou uma metodologia “*In house*”, radioimunoensaio de competição com um anticorpo policlonal anticortisol.

Em relação à faixa etária, dois estudos avaliaram adultos e nove incluíram díades mãe-filho, incluindo crianças de até 7 anos. Em todos os estudos, testes padronizados foram utilizados para a caracterização dos desfechos. Quanto ao desfecho principal, apenas dois trabalhos avaliaram DI, distúrbios do neurodesenvolvimento associados à DI e comportamento auto lesivo crônico (Symons et al. 2011) e DI leve ou moderada (Presland et al. 2013). Dentre os outros desfechos avaliados, encontram-se o desenvolvimento motor (fino) e cognitivo (Saridjan et al. 2014); desenvolvimento cognitivo e psicomotor (Andiarena et al. 2017); desenvolvimento motor e cognitivo (Bergman et al. 2010, Haselbeck et al. 2017); atraso do desenvolvimento psicomotor (Haquin Macari et al. 2019); desenvolvimento infantil mental e psicomotor (Davis e Sandman 2010); QI na infância (7 anos) (LeWinn et al. 2009); desenvolvimento motor e mental (Huizink et al. 2003) e função e desenvolvimento neurocomportamental (Osborne et al. 2018).

A seguir, os resultados dos estudos incluídos na revisão são apresentados seguindo as etapas cronológicas de desenvolvimento. De acordo com o conceito de programação fetal, o sofrimento pré-natal tem consequências duradouras na saúde da prole (Barker 1998, 2002). A depressão maior em mulheres grávidas, avaliada prospectivamente em 49 casos vs. 57 controles saudáveis, teve uma associação com pior avaliação neurocomportamental de bebês a termo (6 dias pós-natal), para 4 dos 5 domínios

neurocomportamentais (estabilidade autonômica, regulação do estado, orientação e motora). A associação permaneceu estatisticamente significativa após o ajuste para variáveis sociodemográficas e outros potenciais confundidores (valores de p variando de 0,001 a 0,036) (Osborne et al. 2018). Em uma coorte prospectiva ($n=170$), altos níveis de cortisol na gravidez foram relacionados a pontuações menores no índice de desenvolvimento mental do feto aos 3 meses após o nascimento e no índice de desenvolvimento psicomotor aos 3 e 8 meses de idade (Huizink et al. 2003). As concentrações de cortisol materno durante a gestação teve associação com a trajetória do desenvolvimento mental infantil durante o primeiro ano (Davis e Sandman 2010). Em uma coorte prospectiva de 125 díades mãe-filho, alto cortisol materno no final da gestação (37 semanas) esteve associado com desenvolvimento favorável do bebê, resultando em uma tendência para maiores pontuações brutas de desenvolvimento mental aos 12 meses ($t = 1,6$, $p = 0,10$), levantando a hipótese da existência de um período sensível (Davis e Sandman 2010). O estudo de Haselbeck (2017) encontrou, ao longo do acompanhamento de 49 bebês, cujas mães reportaram maior sofrimento pré-natal, uma correlação positiva com um temperamento mais difícil (nas categorias "movimento verticalmente" ($r = 0,44$, $p = 0,02$) e "movimento de perna e pé" ($r = 0,47$, $p = 0,01$) e correlação negativa com menor desenvolvimento motor fino ($r = 0,44$, $p = 0,02$) aos 16 meses (Haselbeck et al. 2017).

Outros estudos confirmam que os níveis do cortisol diurno estão associados ao funcionamento cognitivo numa idade jovem. Níveis mais altos de cortisol secretados durante o dia foram associados a um risco maior de atraso na produção da linguagem (razão de *odds* por pontuação padronizada em escore z : 1,38, IC 95%: 1,03-1,84, $p = 0,03$) em 364 crianças acompanhadas desde o nascimento (Saridjan et al. 2014). Um delineamento longitudinal ($n=186$) identificou que a atividade do sistema de estresse medido por cortisol salivar no início da vida (14 meses) pode estar associada com o neurodesenvolvimento a longo prazo (4 anos de idade). Em meninas, os níveis de cortisol foram associados negativamente com o desenvolvimento cognitivo ($\beta = -17,8$, $p = 0,028$), função executiva ($\beta = -9,8$, $p = 0,08$) e desenvolvimento motor bruto ($\beta = -13$; $p = 0,022$). Em meninos, os níveis de cortisol foram negativamente associados ao desenvolvimento socioemocional (Risco Relativo = 1,6, $p = 0,039$) (Andiarena et al. 2017). Já na idade escolar, em 832 crianças acompanhadas desde o nascimento, maiores níveis de cortisol durante o terceiro trimestre da gestação foram associados a menores escores de QI verbal aos 7 anos de idade; em média, estas crianças apresentarem escores 3,83 pontos (IC 95%:

1,22 a 6,44) mais baixos do que aqueles no quintil mais baixo de exposição ao cortisol (LeWinn et al. 2009).

Resultados controversos foram observados em estudos avaliando o índice de qualidade do relacionamento pais-bebê como um potencial moderador da exposição pré-natal ao cortisol. Um estudo longitudinal (n=125) identificou que o nível de cortisol *in utero* (no líquido amniótico) apresentou correlação inversa significativa com os escores padrão da Escala de Desenvolvimento Cognitivo de Bayley ($r(n=125) = -0.25, p < 0.01$), porém essa associação é atenuada por um ambiente de criação favorável. A associação com apego seguro foi essencialmente nula ($r(n=70) = 0.05$, não significativo) (Bergman et al. 2010). Um estudo transversal (n=42) teve como objetivo descrever a associação entre atraso de desenvolvimento psicomotor e concentração de cortisol salivar em crianças <2 anos que vivem na prisão com suas mães e comparar os resultados com aqueles observados em crianças que não estão neste regime. O atraso do desenvolvimento psicomotor foi mais frequente entre as crianças que moravam fora do presídio: as prevalências foram 2,3% e 28,5% respectivamente (Teste de Fisher $p = 0,06$). Diante destes resultados, os autores postulam que o contato das crianças com suas mães e o estímulo que receberam na creche da prisão poderiam influenciar os resultados observados. Não foram encontradas associações entre atraso de desenvolvimento psicomotor e cortisol salivar (Haquin Macari et al. 2019).

Considerando os únicos dois estudos conduzidos em adultos, o primeiro se propôs a avaliar o perfil do cortisol em um estudo transversal de 16 indivíduos com DI leve ou moderada. Os perfis obtidos foram semelhantes, tanto em termos de magnitude absoluta quanto de forma, aos descritos anteriormente para indivíduos em populações saudáveis sem DI (Edwards et al. 2001). Porém, houve uma correlação positiva significativa entre a Escala de Ansiedade de Autoavaliação de Zung para adultos com DI e área sob a curva (amostras matinais; $r = 0,637, p = 0,026, n = 12$). Adicionalmente, indivíduos com história recente de agressão, medida por uma pontuação >5 na escala de agressão aberta modificada, foi associada com níveis de cortisol mais elevados ($t = -2,7, p = 0,01$), quando comparado com participantes que obtiveram uma pontuação mais baixa da mesma escala (Presland et al. 2013). Entretanto, no segundo estudo em adultos (n=51) com distúrbios do neurodesenvolvimento associados à DI e comportamento auto lesivo crônico (SIB), o cortisol não diferiu significativamente pelo nível de DI entre os grupos ($p = 0,3$), porém

diferenças dos níveis de cortisol foram significativas ($p < 0,01$) entre o grupo SIB e o grupo controle, sugerindo uma associação entre SIB e o eixo HPA (Symons et al. 2011).

Ao longo do ciclo vital, os achados na revisão da literatura apresentam evidências de associação entre níveis de cortisol e o desenvolvimento cognitivo, iniciando no período gestacional, passando pela idade escolar e chegando até a idade adulta. Porém, algumas lacunas no conhecimento foram detectadas: 1. não foram encontrados estudos avaliando a associação entre estresse/níveis de cortisol no período da adolescência; 2. apenas dois trabalhos focam especificamente na DI, sendo que um deles utilizou um tamanho amostral muito pequeno; 3. em 45% dos trabalhos não se discute a possibilidade de confundimento, nem são feitas quaisquer tentativas de ajuste para reduzir viés; 4. na maioria destes estudos, o estresse é medido através de autorrelato ou de amostras biológicas nas quais o cortisol é aferido apenas uma vez ou em replicata. Medidas deste tipo podem diferir dentro do mesmo estudo (como um destes exemplos, Haselbeck, 2017; Bergman, 2010), nos quais os níveis de cortisol das amostras biológicas não refletem a condição autorrelatada, o que reduz o poder estatístico e pode produzir resultados controversos. Nenhum dos estudos identificados avalia a associação do estresse crônico que, segundo a literatura atual, pode ser aferido corretamente através do cortisol capilar (Raul et al., 2004). Dadas as várias limitações supramencionadas, se fazem necessárias novas pesquisas utilizando metodologias mais robustas, com amostras maiores, de base populacional e de ampla disponibilidade de potenciais confundidores, bem como mensuração do cortisol capilar, que permita avaliar estresse crônico.

Como resultado dessa revisão se apresentam evidências de associação entre níveis de cortisol como uma possível causa de regulação do desenvolvimento cognitivo do indivíduo, o que permite levantar a hipótese de que esta associação poderia estar mediada pela atividade do eixo HPA. Porém, uma vez estabelecida/desenvolvida a condição da DI, não fica claro qual é a direção dessa associação, sendo necessárias novas abordagens que permitam tentar esclarecer estas lacunas do conhecimento. Ademais, e considerando o efeito deletério que o estresse crônico tem no organismo, a avaliação da associação dos níveis de cortisol (indicador de estresse crônico) em indivíduos com e sem DI se torna relevante.

4 JUSTIFICATIVA

Do ponto de vista da saúde pública, a DI tem impacto tanto em nível individual, quando considera-se a extensão da incapacidade, quanto em nível coletivo, se se considera a presença de morbidades e custos de diagnóstico e de tratamento associados (Costa e Victora 2006). Aqueles com transtornos mentais podem ter períodos de capacidade reduzida de participação na força de trabalho, o que pode resultar em falta de renda para o indivíduo (Schofield et al. 2011). A falta de participação na força de trabalho também pode contribuir para um custo social substancial devido à perda de produção e redução da tributação sobre a renda - além do custo direto do tratamento (Schofield et al. 2011). Assim, estudos de fatores envolvidos na etiologia da DI são importantes para indivíduos e populações. Porém, apesar de existir uma ampla literatura disponível, as causas da DI ainda não são totalmente conhecidas devido à sua extensa heterogeneidade clínica e genética. Contudo, recentes desenvolvimentos na área de genética molecular e bioinformática resultam em possibilidades promissoras para contribuir ao preenchimento desta lacuna.

Na revisão de literatura deste projeto, identificou-se que o WES tem importância no diagnóstico da DI, já que pode contribuir para a descoberta de novos genes envolvidos na sua etiologia pois apresenta boas taxas de diagnóstico. O aumento do número de artigos originais nos últimos anos é notável. Esses artigos exploram algumas abordagens metodológicas com impacto na taxa de diagnóstico genético em pacientes com DI via WES, entre as quais, por exemplo, a adequação do delineamento de estudo, o uso combinado de WES com outras metodologias de diagnóstico e a otimização e padronização dos métodos de chamada das variantes. Entretanto, as revisões de literatura publicadas até o momento, além de temporalmente defasadas, não avaliam ou discutem o uso destas diferentes metodologias como potencializadoras do WES no diagnóstico da DI e na elucidação da sua etiologia. Ainda, algumas delas são específicas, não fornecendo uma discussão ampla sobre o tema. Por exemplo, a mais recentemente publicada incluiu apenas casos de DI com herança autossômica recessiva (Kuchay et al. 2019).

Adicionalmente, grande parte dos estudos incluídos na revisão utilizaram amostras clínicas. Estudos com amostras de base populacional podem fornecer estimativas realistas de prevalência de DI. Explorar o recurso do WES em pacientes idiopáticos de amostra populacional que já foram avaliados por outros métodos diagnósticos pode fornecer

informações relevantes sobre a utilidade da técnica, tanto nas taxas de diagnóstico, quanto na elucidação da etiologia da doença. Assim, este projeto se propõe a avaliar uma subamostra de indivíduos com DI idiopática pertencentes à Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004, empregando WES. Tendo em vista a disponibilidade de dados oriundos de uma extensa avaliação genética, clínica e laboratorial, será possível avaliar a ocorrência de variantes patogênicas *de novo* responsáveis pelo fenótipo da DI. A incorporação do WES para investigação etiológica de DI de causa indeterminada, foi aprovado como procedimento ambulatorial de alta complexidade no âmbito do Sistema Único de Saúde (Portaria nº 18, publicada no Diário Oficial da União nº 61, seção 1, página 98, em 29 de março de 2019) (Diários Jusbrasil 2019), mas atualmente não é disponibilizado, principalmente por dificuldades de incluir esta tecnologia na prática clínica. Assim, este estudo pode contribuir para validar essa portaria, no sentido de demonstrar a necessidade da sua implementação. Além do ponto de vista científico, estes resultados permitirão alocar os adolescentes e seus familiares dentro de grupos de risco, beneficiando-os diretamente, uma vez que poderão possibilitar medidas terapêuticas e de prevenção familiar adequadas, o que pode impactar positivamente tanto os indivíduos como os serviços de saúde.

Sabe-se que crianças com distúrbios neurológicos e/ou comportamentais podem apresentar respostas neuroendócrinas diferentes em relação às crianças sem comprometimento neurológico (Blomqvist et al. 2007). A existência de uma relação causal entre estresse e DI, bem como a direção de uma eventual relação causal (ou seja, qual seria a causa e qual seria a consequência) ainda não é bem estabelecida (Lupien et al. 2007, Shonkoff et al. 2009, 2012). Por estar associado a diversas condições de saúde (Lee et al. 2015), o estresse crônico pode acarretar comorbidades e agravamento do quadro clínico de pacientes de DI (Shonkoff et al. 2012), e, com isso, prejuízos na adaptabilidade junto à família. Entretanto, na revisão da literatura deste projeto, observou-se uma escassez de estudos explorando a relação entre a atividade do eixo HPA e DI. Quando foi explorada, investigou-se principalmente díades, mãe-filhos nos primeiros anos de vida ou na fase adulta. Os estudos, na sua maioria, utilizam amostras de saliva, o que gera muita variabilidade nos níveis de cortisol aferidos por serem afetados pelo horário da coleta e o estresse gerado pelo procedimento da coleta em si. Além disso, na maioria dos estudos identificados, não há grupos de comparação e nenhum dos trabalhos avaliou o estresse crônico. Neste projeto, pretende-se avaliar a associação entre níveis de cortisol capilar como um indicador de estresse crônico em indivíduos com DI, e sem DI como grupo de comparação, em uma subamostra de adolescentes da coorte de nascimento Pelotas 2004.

Portanto, o presente projeto utiliza-se de abordagens genética e fisiológica para contribuir com o conhecimento acerca dos mecanismos biológicos envolvidos na DI, utilizando dados de uma coorte de nascimentos de base populacional. Essa abordagem permitirá a comparação entre os indivíduos e sua avaliação em diferentes momentos do ciclo vital.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar a etiologia genética da DI e compreender mecanismos fisiológicos relacionados ao estresse crônico em adolescentes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004 aos 15 anos de idade.

5.2 Objetivos específicos

1. Descrever a importância do WES para o diagnóstico e a compreensão da etiologia genética da DI por meio de uma revisão sistemática da literatura.
2. Identificar mutações *de novo* causadoras de DI através de WES em adolescentes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.
3. Testar a associação entre a concentração de cortisol capilar e DI nos adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004, no acompanhamento dos 15 anos de idade.

6 HIPÓTESES

6.1 Hipótese geral

Aspectos genéticos (variantes patogênicas *de novo*) são fatores de risco na etiologia da DI, e na fisiopatologia da DI. Os níveis de cortisol têm maior aumento durante o estresse crônico, do que na ausência de DI.

6.2 Hipóteses específicas:

1. A literatura apresentará um aumento nas evidências do uso da tecnologia de WES como uma ferramenta útil para diagnóstico e descoberta de novos genes na pesquisa da DI;

2. O WES de adolescentes com DI idiopática participantes da Coorte 2004 e seus pais identificará mutações *de novo* (variantes patogênicas) responsáveis pelo fenótipo de DI;

3. Os níveis de cortisol capilar serão maiores nos adolescentes de 15 anos de idade com deficiência intelectual (DI) comparados com os demais participantes sem DI da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.

7 MÉTODOS

A apresentação da metodologia dos estudos planejados foi dividida em três itens. O primeiro item descreve a metodologia do artigo de revisão sistemática da literatura (item 7.1). Os dois últimos descrevem os dois estudos originais (item 7.2), nos quais se utiliza a Coorte de Nascimentos de Pelotas 2004: um, com abordagem de exoma (item 7.2.1) e outro avaliando estresse crônico (item 7.2.2).

7.1 Revisão sistemática (artigo 1)

O objetivo desta revisão sistemática da literatura é identificar os estudos existentes sobre a importância do WES na pesquisa de aspectos genéticos da condição de DI.

7.1.1 Fonte de dados

A busca será realizada através da base de dados indexadas na Pubmed, Web of Science, Scopus, Science direct, Bireme e PsycINFO. Além dos artigos identificados na busca, as listas de referências dos artigos originais selecionados, bem como de artigos de revisão relevantes identificados na busca, serão verificadas.

A busca será realizada de acordo com os termos Medical Subject Heading (MeSH) de interesse a revisão em questão, conforme os descritores: "Intellectual disability" / "mental retardation" / "whole exome sequencing" / "genetics "[MeSH Terms]. Estes descritores serão combinados da seguinte forma: "Intellectual disability" OR "mental retardation "AND "whole exome sequencing" AND "genetics" NOT "syndrome" NOT "neurodevelopment" NOT "case reports" OR "case report". Desta forma, a busca será limitada a artigos que contenham pelo menos um descritor presente em cada tópico. Optou-se por utilizar uma chave de busca que contenha o descritor "genetics", objetivando restringir os artigos que não contiverem aspectos moleculares e genéticos em seu texto, mas mantendo a abrangência da busca.

As referências recuperadas serão importadas para o programa Zotero. Após a obtenção da lista de artigos e remoção de duplicatas, a revisão será realizada independentemente por dois avaliadores. Inicialmente será feita uma triagem pela leitura dos títulos e resumos, seguida da leitura na íntegra dos artigos pré-selecionados. Discordâncias serão resolvidas por consenso entre os avaliadores e, quando necessário, um terceiro avaliador será consultado.

Os artigos identificados serão apresentados e discutidos narrativamente, e conclusões gerais serão traçadas de forma qualitativa. O protocolo da revisão será depositado na plataforma PROSPERO.

7.1.2. Critérios de elegibilidade

Serão considerados elegíveis para a presente revisão todos aqueles estudos realizados em seres humanos, nos idiomas espanhol, português e inglês, sem restrição quanto a seus delineamentos. Serão excluídos estudos referentes a síndromes específicas, artigos que se referirem a formas mais amplas de atraso do desenvolvimento como desfecho principal, assim como relatos de caso e artigos com tamanho amostral inferior a 10 indivíduos. Também serão excluídos estudos do tipo gene-candidatos e estudos *in silico*, cartas a editor, comentários e resumos de congresso. Artigos de revisão serão utilizados apenas para busca nas listas de referências, mas não serão efetivamente incluídos nos resultados da busca.

O formulário de extração de dados incluirá as seguintes informações: autores, ano de publicação, país, população, tamanho amostral, delineamento, método de mensuração do QI, avaliação do fenótipo de DI por WES e resultados obtidos. As informações extraídas dos artigos identificados serão apresentadas e discutidas de maneira narrativa, cumprindo com as especificações dispostas no PRISMA, que é um conjunto mínimo de itens baseado em evidências para relatar em revisões sistemáticas e meta-análises.

7.2 Estudos Originais

Ambos os estudos originais utilizarão dados da coorte de nascimentos em Pelotas (RS) em 2004. A seguir, é descrito o delineamento desta coorte. Após, são descritos os aspectos metodológicos particulares de cada estudo original.

No ano de 2004 todos os nascidos vivos nas maternidades da cidade de Pelotas, cujas famílias residiam na zona urbana do município, foram elegíveis para participar do estudo. Das 4.263 crianças identificadas, 4.231 participaram do estudo perinatal, caracterizando o tamanho amostral desta coorte. Foram realizados sete acompanhamentos desde 2004: aos 3, 12, 24, 48 meses, e aos 6-7, 10 e 15-16 anos de idade (estando este

acompanhamento ainda em andamento). De forma geral, foram coletadas variáveis referentes à saúde, dieta e estilo de vida das famílias, condições de moradia, comportamentos de saúde, assistência médica e qualidade de vida das crianças e de suas mães. Outras medidas incluem: medidas de composição corporal, atividade física, espirometria e pressão arterial, além da aplicação de testes para avaliação da cognição e saúde mental. Informações mais detalhadas sobre este estudo podem ser encontradas em Barros et al 2006 (Barros et al. 2006, Santos et al. 2014). A partir do acompanhamento aos 7 anos, foi estabelecida uma coorte aninhada ao estudo principal (n=214) de crianças com deficiência intelectual, acompanhada ainda na atualidade. Foram utilizadas as escalas WPPSI (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence) e WISC-III (Wechsler 1983, 1992), aos 4 e os 7 anos de idade, para estimar o QI e complementar o diagnóstico clínico e laboratorial dos indivíduos sob suspeita de DI. Neste subestudo, as crianças foram acompanhadas aos 6-7, 10 e aos 15-16 anos de idade. Um estudo recente (Karam et al. 2015) avaliou clínica e laboratorialmente essas crianças com suspeita de deficiência intelectual (DI), esclarecendo a etiologia em aproximadamente metade dos casos. De uma prevalência total de 4,5%, 20,5% foi de origem genética. Contudo, uma parcela substancial foi classificada como idiopática e 12,6% idiopática (Karam et al. 2015). Indivíduos elegíveis desta subamostra (n=214) representam o principal foco de estudo deste projeto.

A parte inicial da realização deste projeto foi em sincronia com o acompanhamento dos 15-16 anos da coorte principal. Este acompanhamento, que inclui a coorte aninhada dos casos de DI, iniciou em 20 de novembro de 2019 e continua em andamento, no Centro de Pesquisas Epidemiológicas Dr. Amílcar Gigante da UFPel. Os participantes do subestudo passaram por avaliação genético-clínica que incluiu anamnese, exame físico e dismorfológico e avaliação do comportamento adaptativo. Em virtude do início da pandemia do novo coronavírus, as atividades do acompanhamento foram suspensas em 18 de março de 2020, tendo sido avaliados 1944 participantes da coorte geral, incluindo 91 participantes do subestudo de DI.

7.2.1 Estudo Original 1 (artigo 2)

7.2.1.2 Participantes do estudo

Será estudada uma amostra de 13 indivíduos pertencentes ao do subestudo de adolescentes apresentando DI. Esses indivíduos foram classificados como casos de DI

idiopática, tendo sido extensivamente investigados clínica e molecularmente sem causa da DI esclarecida.

7.2.1.3. Delineamento

Série de casos de DI dentro de uma coorte de nascimentos. Será conduzido um estudo envolvendo trios familiares (adolescente e seus pais biológicos sempre que possível) para investigação de mutações genéticas *de novo*. Caso ambos dos pais não estejam disponíveis, serão analisadas duplas ou casos simples.

7.2.1.4 Mensuração de dados

7.2.1.5 Avaliação clínico-laboratorial

Após a identificação dos indivíduos através dos registros no banco de dados, foi feita sua reavaliação clínica aos 15/16 anos de idade, o que incluiu anamnese, exame físico e rastreamento de alterações no comportamento adaptativo. Também se realizou entrevista e exame físico das mães e pais, seguida de coleta de material biológico.

Os critérios de inclusão neste estudo foram: a) fazer parte do subestudo de DI; b) ter DI de etiologia inespecífica, após investigação clínica e laboratorial; c) mãe e/ou pai biológicos terem aceitado doar material biológico.

Dentre os 91 adolescentes do subestudo de DI avaliados aos 15/16 anos, 13 cumpriram os critérios de inclusão. Desses, sete são do sexo masculino (54%) e oito adolescentes tiveram ambos os pais biológicos incluídos no estudo. Os demais tiveram apenas um dos pais doadores de amostra biológica devido a falecimento de um dos genitores ou do insucesso em localizar os mesmos após diversas tentativas.

7.2.1.6 Procedimentos laboratoriais e sequenciamento do exoma

- Amostras, extração e purificação do DNA.

Em oito adolescentes, o DNA genômico foi extraído a partir de amostras de sangue periférico coletado em 2011, através da técnica de *salting out* (Miller et al. 1988) e já se encontra armazenado no laboratório do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPel. O DNA genômico de todos os pais e dos outros quatro adolescentes foi obtido a partir de

amostras de saliva coletadas entre 2019 e 2020, utilizando o kit OG-500 (DNAGenotek), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, o DNA foi quantificado por absorvância no espectrofotômetro NanoDrop. Todas as amostras foram armazenadas em um congelador bloqueado a -20 °C.

- Transporte de amostras

As amostras foram enviadas para o laboratório colaborador por meio de transportadora qualificada. Os processos de sequenciamento e análises de bioinformática estão sendo realizados em laboratório terceirizado (Laboratório Fleury-<https://www.fleurygenomica.com.br/>) com experiência na metodologia especificada.

- Sequenciamento, processamento e análise de dados

O WES está sendo realizado usando o kit Twist Human Core Exome (Twist bioscience) em um sequenciador Illumina (Illumina, Inc.). A sequência consiste em ~20.000 genes. O número total de leituras sequenciadas é aproximadamente: 38.347.598. Cobertura média da região alvo: 93,85x; com 97 % da região alvo com cobertura maior ou igual a 20x, considerando que a região alvo se refere à região codificante e sítios de *splice* dos genes analisados.

Após o sequenciamento, será realizado o alinhamento e detecção de mutações com base na versão GRCh37 do genoma humano, através de processos customizados de bioinformática (algoritmo germinativo v3.5). As variantes serão interpretadas considerando o quadro clínico do paciente e o protocolo de classificação de variantes do Colégio Americano de Genética Médica (ACMG). Quando detectadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, serão realizadas análises de segregação, incluindo a análise do DNA dos pais para essas regiões específicas pelo método de sequenciamento convencional de Sanger (Sanger et al. 1977).

Algumas limitações da metodologia devem ser consideradas. O WES não avalia regiões não codificantes do genoma, portanto não é capaz de identificar eventuais variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas fora do exoma. O WES também não é a melhor ferramenta para avaliar condições genéticas associadas a expansões de polinucleotídeos, eventos genéticos complexos como inversões, translocações e expansões repetidas ou condições derivadas de alterações do DNA mitocondrial (mtDNA).

Na interpretação dos resultados do WES, pseudogenes, sequências com alta identidade e sequências repetitivas podem interferir na avaliação de variantes genômicas, assim, avaliam-se variações no número de cópias (CNVs) que compreendam 3 ou mais éxons e não são descritas as coordenadas genômicas dos pontos de quebra para variantes do tipo CNV. Mas estas limitações serão sopesadas com dados obtido em avaliações moleculares anteriores destes pacientes.

- Resultados esperados

As informações de cada indivíduo, correspondentes a avaliação de todos os genes humanos, identificação de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas causadoras de fenótipos e confirmação por método Sanger no indivíduo e genitores, assim como achados incidentais, serão reportadas em laudo técnico com avaliação de médico geneticista. Adicionalmente, a data bruta resultante de cada participante será obtida, com a possibilidade de ser reanalisada no futuro. Estima-se que o prazo para concluir e entregar os resultados é janeiro do ano 2021.

7.2.1.7 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da UFPel. Parecer consubstanciado do CEP em anexo (Anexo I).

7.2.2 Estudo Original 2 (artigo 3)

7.2.2.1 Participantes do estudo

A população em estudo é composta por todos os indivíduos pertencentes à Coorte de nascimentos de Pelotas de 2004 que foram avaliados aos 15 anos de idade.

7.2.2.2 Delineamento

Será realizado um estudo transversal com os dados do acompanhamento dos 15 anos de idade da coorte, avaliando a associação entre níveis de cortisol capilar e DI.

7.2.2.3 Desfechos e exposições de interesse

Como desfecho, concentração de cortisol (em pg/mg) avaliada em amostras de 3 cm de cabelo, correspondente a aferição do estresse crônico dos últimos três meses anteriores à data da coleta (variável contínua).

Como exposição, será utilizada a presença/ ausência de DI (variável dicotômica).

7.2.2.4 Critérios de inclusão

Serão incluídos no estudo os seguintes indivíduos:

- a. Para os indivíduos com DI: terem sido avaliadas no subestudo de genética aos 7-8 e aos 15 anos idade, ter diagnóstico clínico de DI e ter medidas de cortisol capilar válidas.
- b. Para o grupo de comparação: ter medidas de cortisol capilar válidas.

7.2.2.5 Procedimentos de coleta e medição do cortisol capilar:

Para a aferição da concentração de cortisol capilar, primeiramente é coletada uma pequena mecha de cabelo da região da coroa. Coletadores devidamente treinados fazem a coleta de uma mecha de cabelo o mais próximo possível do couro cabeludo, seguindo o protocolo do manual em anexo (anexo 3). Após coletado, o material é enviado para o laboratório do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPel.

No laboratório, a amostra de cabelo é manipulada para corte de 3 cm de cabelo (25 mg) do vértice próximo ao extremo da raiz. Cada amostra de cabelo é lavada duas vezes

em isopropanol para remover qualquer contaminação da parte externa do cabelo. Após a secagem por 48 horas, a amostra é moída até pulverizar para quebrar a matriz de proteína do cabelo e aumentar a área de superfície de contato para extração de cortisol. O cortisol do interior da haste do cabelo é extraído em etanol em dois ciclos de 48 horas no agitador. Após, o etanol é evaporado e o extrato é reconstituído em tampão de ensaio de ELISA. As amostras com cortisol extraído, serão analisadas usando um imunoenensaio enzimático competitivo de alta sensibilidade, Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay (SALIMETRICS ASSAY #1-3002), seguindo as recomendações do protocolo estabelecido pelo fabricante (Salimetrics, State College, PA).

7.2.2.6 Aspectos éticos

O procedimento para a coleta de cabelo está incluído nos protocolos do acompanhamento dos 15-16 anos do estudo da Coorte de 2004 e foi aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina da UFPel, sendo obedecidos os princípios éticos em todas as fases do estudo. Parecer consubstanciado do CEP em anexo (Anexo II).

7.2.2.7 Plano de análise

Através da revisão de literatura, foram identificados fatores possivelmente associados tanto com o desfecho, quanto com a exposição. Uma revisão que incluiu dezessete estudos (contabilizando 55.344 indivíduos com o desfecho e 5.723.749 indivíduos sem o desfecho) identificou 16 fatores de risco para DI (Huang, 2016), dentre dos quais entende-se como principais: baixa escolaridade materna, sexo masculino e baixo peso ao nascer. Adicionalmente a esses fatores, consideramos a inclusão de: nível socioeconômico (NSE), no intuito de integrar na pesquisa fatores sociocomportamentais (Anderson 1998) e carga genética, que como descrevemos ao longo deste projeto, tem grande influência, tanto na DI (Kvarnung e Nordgren 2017), quanto na atividade e função do eixo HPA (Mormede et al. 2011). Para os níveis de cortisol capilar, foram identificados fatores associados através de uma revisão que incluiu trinta e nove estudos. Apesar de dados escassos e alguns inconsistências com respeito a idade, sexo, escolaridade materna e NSE, conclui-se que as concentrações de cortisol no cabelo estão associadas à atividade física intensa e uso de medicamentos específicos para regular o funcionamento do eixo HPA (Wosu et al. 2013).

Neste cenário, as relações causais entre as variáveis que levaram a formular as hipóteses estão apresentadas no DAG (Figura 8).

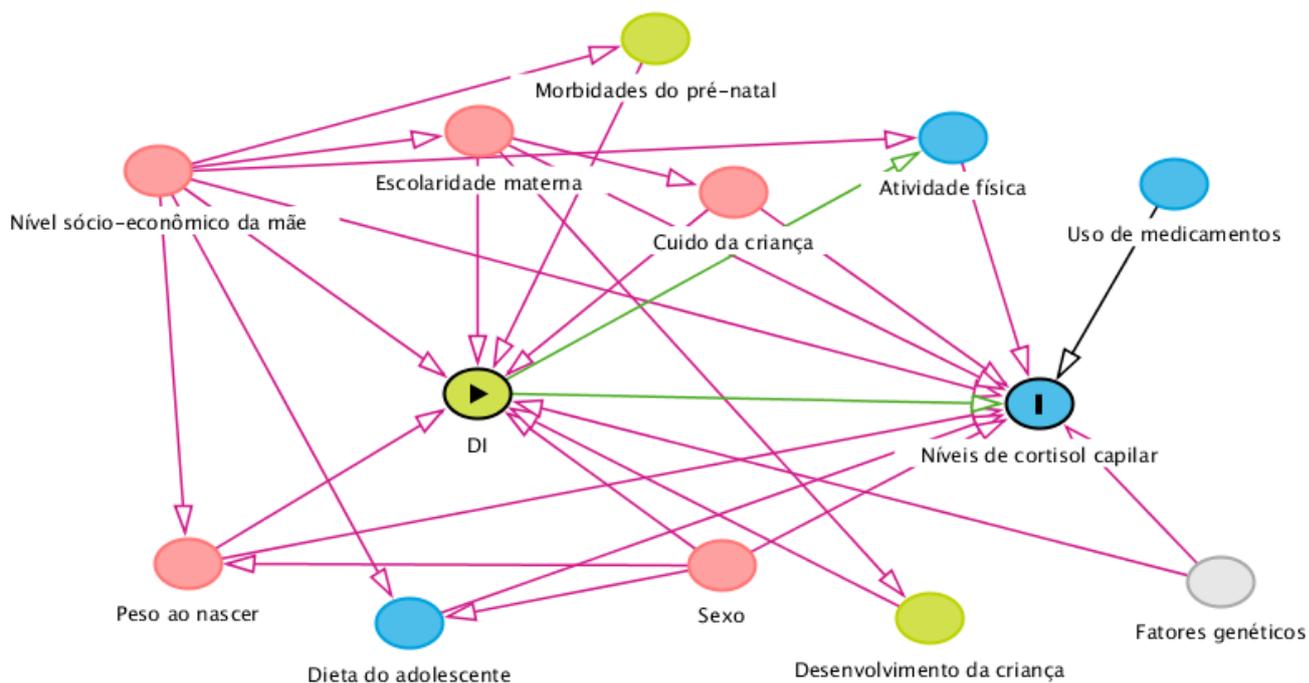


Figura 8. Gráfico acíclico direcionado (DAG) representando as relações causais entre as variáveis envolvidas na possível relação entre os níveis de cortisol e a condição de DI. A seta verde representa caminhos causais entre exposição e desfecho. A seta e variáveis em cor rosa representam possíveis caminhos de confundimento. A cor cinza indica variáveis não medidas, a cor verde indica outros determinantes da exposição e a cor azul indica outros determinantes do desfecho. O diagrama foi construído utilizando o software DAGitty (disponível em <http://www.dagitty.net>).

7.2.2.8 Análise

As variáveis independentes e dependentes propostas no presente artigo terão a sua distribuição avaliada por meio de histogramas e serão descritos de acordo com medidas de tendência central. Para a análise descritiva, as frequências serão comparadas por testes de qui-quadrado para heterogeneidade. Para avaliar a associação entre níveis de cortisol e DI aos 15-16 anos, será usado teste t e análise de variância (ANOVA), assim como Regressão linear multivariada ajustando por possíveis confundidores.

9 FINANCIAMENTO

Os artigos originais (2 e 3) utilizarão dados provenientes da coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. O acompanhamento dos 15/16 anos da coorte obteve recurso financeiro do Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT). O artigo 2 também utiliza financiamento do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP) para o processamento das amostras e sequenciamento dos pacientes, sob a coordenação da Professora Simone de Menezes Karam. Para o artigo 3, o financiamento da *Wellcome Trust* está sendo utilizado para a realização das coletas biológicas para aferir o cortisol capilar, a cargo do coordenador Professor Joseph Murray.

A doutoranda Karen Sánchez recebe bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

10 APÊNDICES

Quadro 1. Descrição dos estudos que investigaram o diagnóstico de DI via WES incluídos na revisão sistemática da literatura.

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
de Ligth J, (2012); Holanda	Trio / N= 100	<10 anos = 37 10–20 anos = 41 >20 anos = 22	53 Mulheres / 47 Homens	Não	Deficiência intelectual inexplicável (definida como um QI de <50)	-	SOLiD 4 System sequencing (Life Technologies).	16.00 %
Rauch A, (2012); Alemanha e Suíça.	Trio / N= 51	-	32 Mulheres / 19 Homens	Não	Deficiência intelectual grave com função motora grosseiramente preservada, ausência de malformações, ausência de anomalias menores específicas da síndrome, ausência de sinais neurológicos específicos, ausência de variantes do número de cópias causais por cariotipagem molecular de alta resolução e doença esporádica.	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	39.00 %
Ohba C, (2013); Yokohama, Japam	Família / N= 25	2 – 20 anos (ao estudo)	6 Mulheres / 3 Homens (nos diagnosticados)	-	Atraso no desenvolvimento motor, e pacientes com uma deficiência intelectual. Todos os pacientes apresentaram sinais cerebelares, como ataxia dos membros e tronco, apraxia oculomotora, dismetria.	-	Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)	39.10 %

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
Willensem M, (2014); Holanda	Trio / N= 42 trios de 253	0-18 anos =40 18-40 anos =84 >40 anos= 110	149 Mulheres / 85 Homens	Sim	Presença de DI inexplicada (QI≤70 ou idade de desenvolvimento equivalente a ≤ 12 anos)	-	SOLiD 4 System sequencing (Life Technologies)	45.20 %
Srivastava S, (2014); USA	Coorte / N= 78	8.6 anos (rango=1.6 -26.3 anos);	41Homens/ 37 Mulheres	Sim 12%	A maioria dos 28/32 mutados (n = 28) tinha DI ou DD, com base em avaliações de marcos do desenvolvimento e habilidades adaptativas, bem como desempenho em tarefas cognitivas.	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	41.00 %
Hamdan F (2014); Vancouver, Canadá	Trio / N= 41	Média 10.5anos (2-29anos)	18 Homens/ 23 Mulheres	Não	ID moderada (n = 12) ou grave (n = 29), 1) ausência de histórico de DI, epilepsia ou TEA na primeira ou parentes de segundo grau; ausência de alterações específicas na imagem cerebral.	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	29.00 %
Shang L (2015); USA	Trio / N= 4	6-15 anos (ao estudo)	-	-	Algum grau de atraso no desenvolvimento neurológico. Apresentam grandes atrasos motores e começaram a andar entre os 20 e os 24 meses de idade. Hipotonia foi frequentemente relatada. O quociente de desenvolvimento / quociente de inteligência varia de 50 a 89.	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	--

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
Alazami A, (2015); Arábia Saudita	Família / N= 143	-	-	Sim	Diagnóstico neuro genético, história familiar positiva, pais consanguíneos. A deficiência intelectual foi a característica clínica mais comum.	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	73.40 %
Thevenon J, (2016); França	Coorte / N= 43	média 14 anos (rango 2-40 anos)	25 Homens/ 18 Mulheres	-	DI e :i) a ausência de uma forte hipótese diagnóstica após avaliação clínica, (ii) uma avaliação diagnóstica negativa incluindo CGH-array, triagem de X frágil, teste direcionado para desordens de genes únicos.	Presença de características malformativas que podem evocar uma etiologia sindrômica ou a suspeita de um distúrbio adquirido.	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	32.50 %
Monroe G, (2016); Holanda	Trio / N= 17	-	-	Não	-	-	HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA).	29.40 %
Rump P, (2016); Holanda	Trio / N= 38	média 10 anos (rango 0-57anos)	22 Mulher /16 Homen	Sim	-	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	29.00 %
Megahed H, (2016); Cairo, Egito	Família / N= 18	média 4.6 anos (DS 3.2)	6 Mulheres/3 Homens (nos diagnosticados)	Sim	Atrofia cerebelar iniciada na infância e atraso no desenvolvimento. Todos os pacientes mutados exibiram convulsões, atraso no desenvolvimento, atraso no desenvolvimento motor e atraso no desenvolvimento social.	-	HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA).	50.00 %

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
Fieremans N, (2016); França	Coorte / N= 19	<35 anos	19 Mulheres	-	Focamos em indivíduos com DI esporádicos e selecionamos pacientes com fenótipos sindrômicos mais graves	-	HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).	52.60 %
Mcrae A, (2017); Reino Unido	Trio / N= 4293	-	-	-	-	-	Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)	25.00 %
Reuter M, (2017); Síria (71 [46,7%]), Turquia (34 [22,4%]), Egito (19 [12,5%]), Jordânia (7 [4,6%]) e vários outros países (21 [13,8%]).	Família / N= 152	Média 10.3 anos (DS 9.0)	171 Homens/ 126 Mulheres	Sim	O teste cognitivo formal foi realizado sempre que possível ou a gravidade do DI foi estimada de outra forma (grave a profunda em 77 [50,7%] das famílias, leve a moderada em 69 [45,4%] e não especificada em 6 [3,9%]).	-	HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA). SOLiD 5500xL (Life Technologies),	36.80 %
Tan T, (2017); Melbourne, Austrália	Trio / N= 44	Rango 2-18 anos	21 Homens/23 Mulheres	-	Todas as crianças tiveram pelo menos uma avaliação clínica por um geneticista clínico, mas não diagnosticada após a avaliação clínica.	Crianças com fenótipos específicos sindrômicos.	HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA).	35.00 %

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
Harripaul R, (2018); Pakistan/Iran	Família / N= 192	-	-	Sim	As famílias foram recrutadas com base no diagnóstico de DI em mais de um indivíduo (ou DI e / ou dificuldade de aprendizagem para N = 13 famílias; ou ambos, DI e psicose dentro da família, N = 5).	Casos de X frágil, síndrome de Down e outras síndromes claramente reconhecíveis foram excluídos.	SOLiD 5500 (Life Technologies).	51.00 %
Kvarnung M, (2018); Suécia	Família / N= 20			Sim	A apresentação mais comum entre os pacientes foi deficiência intelectual (DI), observada em 14 das 20 famílias	-	Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)	80.00 %
McSherry M, (2018); Turquia	Família / N= 21	range 1.5 meses– 20anos	8 Mulheres/7Homens (nos diagnosticados)	Sim	Pacientes com anomalias menores inespecíficas e sinais neurológicos (por exemplo, convulsões) não foram excluídos da classificação do ID não-sindrômico, pois a maioria dos pacientes com ID tem esses achados.	Pacientes com anomalias importantes, características fenotípicas específicas da síndrome e sinais neurológicos específicos foram excluídos do estudo	Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)	47.60 %
Hu H, (2019); Iran	Família / N= 404	-	-	Sim, 40%	-	A triagem de síndrome do X frágil, falta de cooperação parental.	Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)	54,2%

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
Kahrizi K, (2019); Iran	Trio / N= 100	-	-	Sim	Para determinar o quociente de inteligência (QI) das crianças e seus pais, usamos as Escalas de Inteligência Wechsler para Crianças (WISC) e adultos (WAIS).	-	Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)	61.00 %
Elmas M, (2018); Turkia	Coorte / N= 24	<16 anos	9 Mulheres/ 15 Homens	Sim	Deficiência intelectual e / ou retardo neuromotor ou • têm uma síndrome autossômica recessiva pré-diagnóstica ou • têm várias anomalias congênitas. O Teste de Triagem do Desenvolvimento de Denver II foi usado para determinar o retardo motor e mental em pacientes.	Não ter adequados para herança autossômica recessiva caracteres (os pais não têm casamento consanguíneo) ou, não ter resultado completo do sequenciamento do exoma	The analysis of patients' WES was done by the institutions we have contracted with or by the universities we cooperate With.	83.33 %
Kurki M, (2019); Finlândia do Norte	Coorte / N= 442	do nascimento aos 71 anos	171 Mulheres/271 Homens	Sim	Os testes padronizados de QI utilizados incluíram : Wechsler Preschool And Primary Of Scale (WPPSI), Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC) e Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) para adultos.	-	Illumina HiSeq2000/2500 (Illumina, San Diego, CA, USA)	18.50 %

Autor (Ano); Origem da População	Delineamen to WES / N total	Idade no momento do estudo	Sexo	Consangui- nidade	Critério de inclusão	Critério Exclusão	Plataforma de Sequenciament o	Taxa de diagnostico
Snoeijen- Schouwenaa rs F, (2019); Holanda	Trio / N= 66	Média 24.1 anos (rango 2.8- 67.6 anos)	55 Homens/45 Mulheres	-	ID idiopática: definido como tendo o funcionamento intelectual reduzido (quociente de inteligência <70) e habilidades adaptativas prejudicadas para lidar com as demandas diárias. Além de incluir pacientes com funcionamento intelectual limítrofe (quociente de inteligência = 70-85).	-	5500XL sequencers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).	25.00 %

Quadro 2: Genes envolvidos na etiologia da DI achados por trio-WES, por autor e ano de estudo. Processo e pathway (caminho o rota) anotado para cada.

Referência	Gene	Função do gene	Processo neurobiológico associado	Rota associada
DE LIGT et al., 2012	<i>KIF5C</i>	A proteína codificada por este gene é uma subunidade da cadeia pesada da cinesina envolvida no transporte de carga dentro do sistema nervoso central. Mutações neste gene foram associadas à displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais.	Transporte de proteína axonal anterógrado, transporte dendrítico anterógrado do complexo receptor de neurotransmissor, orientação do axônio, orientação do axônio do neurônio motor, transporte da vesícula sináptica	-
	<i>MTF1</i>	Este gene codifica um fator de transcrição que induz a expressão de metalotioneínas e outros genes envolvidos na homeostase de metais em resposta a metais pesados como cádmio, zinco, cobre e prata.	Desenvolvimento do sistema nervoso central	Respostas celulares a estímulos externos Reactome R-HSA-8953897 Homeostase do cobre WikiPathways WP3286 MTF1 ativa a expressão gênica Reactome R-HSA-5660489
	<i>MYT1L</i>	Este gene codifica um membro da superfamília de dedos de zinco de fatores de transcrição cuja expressão, até agora, foi encontrada apenas em tecidos neuronais. Mutações neste gene foram associadas a uma forma autossômica dominante de deficiência cognitiva e ao transtorno do espectro do autismo.	Desenvolvimento de neurônios, diferenciação de neurônios, especificação de destino de neurônios	-
Mcrae, 2017	<i>ADNP</i>	O peptídeo intestinal vasoativo é um fator neuroprotetor que tem efeito estimulador do crescimento de algumas células tumorais e inibidor de outras.	Regulação negativa do processo apoptótico do neurônio, regulação negativa da transmissão sináptica	
	<i>SMARCB1</i>	A proteína codificada por esse gene faz parte de um complexo que alivia as estruturas repressivas da cromatina, permitindo que a maquinaria transcricional acesse seus alvos de forma mais eficaz.	desenvolvimento do sistema nervoso	Organização da cromatina Reactome R-HSA-4839726 Expressão gênica (transcrição)

	<i>SET</i>	A proteína codificada por este gene inibe a acetilação dos nucleossomos, especialmente da histona H4, pelas histonas acetilases (HAT).	Regulação negativa do processo apoptótico de neurônios	Ciclo celular, Reactome R-HSA-1640170 Ciclo celular, mitótico Reactome R-HSA-69278
	<i>SCN1A</i>	Este gene codifica uma subunidade alfa do canal de sódio, que são essenciais para a geração e propagação de potenciais de ação em células musculares e neurônios. Variantes alélicas desse gene estão associadas à epilepsia generalizada com convulsões febris e encefalopatia epiléptica.	Potencial de ação neuronal, propagação do potencial de ação neuronal	-
Snoeijen-Schouwenaars FM, et al. 2019	<i>CASK</i>	Este gene codifica uma serina proteína quinase que são proteínas-esqueleto e a proteína codificada está localizada nas sinapses do cérebro. Mutações neste gene estão associadas à síndrome FG 4, deficiência intelectual e microcefalia com hipoplasia pontina e cerebelar, e uma forma de deficiência intelectual ligada ao X.	Secreção de neurotransmissor, regulação da exocitose da vesícula sináptica	Sistema neuronal Reactome R-HSA-112316 Receptores de neurotransmissores e transmissão de sinal pós-sináptica, Reactome R-HSA-112314 Ciclo de liberação de neurotransmissor, Reactome R-HSA-112310 Interações proteína-proteína nas sinapses, Reactome R-HSA-6794362
	<i>CACNA1A</i>	Este gene codifica a subunidade alfa-1A, e medeiam a entrada de íons de cálcio nas células excitáveis e também estão envolvidos em uma variedade de processos dependentes de cálcio, incluindo contração muscular, liberação de hormônio ou neurotransmissor e expressão gênica, que é predominantemente expressa em tecido neuronal. Mutações neste gene estão associadas a 2 distúrbios neurológicos, enxaqueca hemiplégica familiar e ataxia episódica 2.	Transmissão sináptica química, modulação da transmissão sináptica química	Caminho da vesícula sináptica, WikiPathways WP2267 Transmissão através do de Sinapses Químicas, Reactome R-HSA-112315
	<i>STXBP1</i>	Este gene codifica uma proteína de ligação à syntaxina. A proteína codificada parece desempenhar um papel na liberação de neurotransmissores por meio da regulação da syntaxina, um receptor de proteína de fixação transmembrana. Mutações neste gene foram associadas à encefalopatia epiléptica infantil-4.	Depressão sináptica de longo prazo, regulação negativa do processo apoptótico do neurônio, regulação negativa da transmissão sináptica, GABAérgica, transmissão sináptica neuromuscular, secreção de neurotransmissor, neurotransmissão	Neurexinas e neuroliginas Reactome R-HSA-6794361 Sistema neuronal Reactome R-HSA-112316 Interações proteína-proteína

			nas sinapses Reactome R-HSA-6794362	
	<i>SCN8A</i>	A proteína codificada é essencial para a rápida despolarização da membrana que ocorre durante a formação do potencial de ação em neurônios excitáveis. Mutações neste gene estão associadas a deficiência cognitiva, atrofia pancerebelar e ataxia.	Mielinização, desenvolvimento do sistema nervoso, potencial de ação neuronal.	-
	<i>FOXG1</i>	A proteína codificada, que funciona como um repressor da transcrição, é altamente expressa nos tecidos neurais durante o desenvolvimento do cérebro.	Desenvolvimento do cérebro, regulação positiva da diferenciação neuronal	Associada a Síndrome de Rett WikiPathways WP3584 Transcrição de RNA polimerase II Reatome R-HSA-738572
	<i>SLC6A1</i>	A proteína codificada por este gene remove o GABA da fenda sináptica, restaurando-o para os terminais pré-sinápticos	Organização de sinapses	Rota da benzodiazepine, Pharmacodynamics PharmGKB PA165111376 Fragil X síndrome WikiPathways WP4549P2882
	<i>NEXMIF</i>	Uma inversão no cromossomo X que foi associada à deficiência cognitiva ligada ao X.	Regulação negativa da migração de neurônios	-
	<i>PURA</i>	Este produto do gene é uma proteína de ligação ao DNA de fita simples e está implicado no controle da replicação e da transcrição do DNA.	Desenvolvimento do sistema nervoso	Regulação do ciclo circadiano WikiPathways WP410
Tan, 2017	<i>NIPBL</i>	Este gene codifica uma proteína que facilita a comunicação potenciador-promotor de potenciadores remotos e desempenha um papel na regulação do desenvolvimento.	Desenvolvimento do cérebro	Ciclo celular Reactome R-HSA-1640170 Ciclo celular, Mitótico Reactome R-HSA-69278
	<i>ANKRD1</i> 1	A proteína codificada por esse gene está localizada no núcleo das células endoteliais e é induzida por estimulação com IL-1 e TNF-alfa.	Regulação positiva do desenvolvimento da projeção de neurônios	Metabolismo de lipidos Reactome R-HSA-556833
	<i>EP300</i>	Funciona como histona acetiltransferase que regula a transcrição via remodelação da cromatina e é importante nos processos de proliferação e diferenciação celular.	Aprendizagem ou memória	Regulação do gene de células-tronco hematopoéticas pelo complexo GABP alfa / beta Ciclo celular, reator mitótico

			R-HSA-69278 Resposta celular à hipóxia Reactome R-HSA-2262749
<i>ARID1A</i>	Este gene codifica um membro da família SWI / SNF, cujos membros têm atividades helicase e ATPase e são pensados para regular a transcrição de certos genes. Em segundo lugar, o terminal C da proteína pode estimular a ativação da transcrição dependente do receptor de glicocorticoide.	Desenvolvimento do prosencéfalo, fechamento do tubo neural	-
<i>GRIN1</i>	A proteína codificada por este gene é uma subunidade crítica dos receptores N-metil-D-aspartato, que desempenham um papel fundamental na plasticidade das sinapses, que se acredita ser a base da memória e do aprendizado.	Desenvolvimento cerebral	Doença de Alzheimer WikiPathways WP2059;Reactome R-HSA-9609736 Orientação do axônio Reactome R-HSA-422475a
<i>ARID1B</i>	Essas duas proteínas funcionam como subunidades ARID alternativas e mutuamente exclusivas do complexo SWI / SNF. Os complexos associados desempenham papéis opostos.	Transmissão sináptica neurônio-neurônio	-

Quadro 3: Descrição dos estudos que investigaram níveis de Cortisol e Neurodesenvolvimento incluídos na revisão sistemática da literatura.

Autor, ano, país	Amostra (N)	Desfecho principal (Instrumento de avaliação-idade)	Medida de cortisol (Amostra-método)	Estatística	Resultados
Huizink, A . 2003 (Holanda - Europa)	170	Desenvolvimento motor e mental (Escala Bayley de Desenvolvimento Infantil- 3, 8 meses)	Saliva materna - radioimunoensaio (competitivo com anticorpo policlonal)	Análise multivariada de covariância (MANCOVA)/Regressão Logística	Altos níveis de ansiedade específica da gravidez no meio da gravidez predizem escores de desenvolvimento mental e motor mais baixos aos 8 meses ($p < 0,05$). Os valores matinais de cortisol no final da gravidez foram negativamente relacionados ao desenvolvimento mental e motor aos 3 meses ($p < 0,05$ e $p < 0,005$, respectivamente) e ao desenvolvimento motor aos 8 meses ($p < 0,01$).
LeWinn, K . 2009 (USA - América)	832	QI da criança (Escala de inteligência Wechsler para crianças - 7 anos)	Sangue materna - imunoensaio enzimático e radioimunoensaio	Regressão linear com um efeito aleatório	Os níveis de cortisol materno foram negativamente relacionados ao QI de escala total, o QI verbal de crianças no quintil mais alto de exposição foi 3,83 pontos mais baixo (CI 95%: -6.44 to -1.22).

Autor, ano, país	Amostra (N)	Desfecho principal (Instrumento de avaliação-idade)	Medida de cortisol (Amostra-método)	Estatística	Resultados
Bergman, K. 2010 (Londres - Europa)	125	Apego bebê-mãe (teste de "Strange Situation" de Ainsworth) e Desenvolvimento Infantil (Escala Bayley- média 17 meses)	Sangue materno e líquido amniótico - radioimunoensaio	Regressão linear múltipla	A exposição pré-natal ao cortisol, previu negativamente a capacidade cognitiva do bebê. Essa associação era inexistente em crianças que tinham um anexo seguro ($r(70).05$, ns).
Davis, E. 2010 (USA - América)	125	Desenvolvimento mental e psicomotor infantil (Escala de Bayley - 3, 6 e 12 meses)	Saliva materna - imunoensaio competitivo de luminescência	Modelagem linear hierárquica (HLM)	Níveis elevados de ansiedade materna específica da gravidez no início da gravidez foram independentemente associados a menores escores de desenvolvimento mental em 12 meses.
Symons, F. 2011 (USA - América)	51	Distúrbios do neurodesenvolvimento associados à deficiência intelectual e comportamento auto lesivo crônico (SIB) (Nível de deficiência intelectual em adultos) com base nos níveis do DSM-IV - leve, moderado, grave	Saliva - imunoensaio enzimático	Kruskal-Wallis/ U de Mann-Whitney/ Análises de correlação	Os níveis de cortisol diferiram significativamente ($p < 0,01$) entre o grupo SIB e o grupo controle (SIB > controle).

Autor, ano, país	Amostra (N)	Desfecho principal (Instrumento de avaliação-idade)	Medida de cortisol (Amostra-método)	Estatística	Resultados
		ou profundo-intervalo, 20-65 anos)			
Presland, A. 2013 (UK - Europa)	16	DI leve ou moderada (O suplemento do cuidador do Glasgow, Escala de depressão e ansiedade de Glasgow para pessoas com DI; Escala de Ansiedade de Autoavaliação de Zung para adultos com ID; Escala de agressão aberta (MOAS)- média 42,9 anos)	Saliva - imunoensaio enzimático	Testes t de amostras independentes ou emparelhadas / Correlações (r de Pearson)	Indivíduos com DI exibem um perfil de secreção diurna de cortisol, qualitativamente semelhante ao da população adulta normal e saudável. Também houve alguma evidência de que a secreção de cortisol foi afetada pela ansiedade e uma história recente de agressão.

Autor, ano, país	Amostra (N)	Desfecho principal (Instrumento de avaliação-idade)	Medida de cortisol (Amostra-método)	Estatística	Resultados
Saridjan, N. 2014 (Holanda - Europa)	364	Desenvolvimento Cognitivo, e desenvolvimento motor fino (Listas de verificação de vocabulário resumidas de MacArthur- 18 meses / Desenvolvimento cognitivo não verbal (Parent Report of Children's Habilidades 30 meses) / Desenvolvimento motor fino (Inventário de Desenvolvimento Infantil de Minnesota (MIDI)- 18 meses)	Saliva criança - imunoensaio com detecção de quimioluminescência	Testes t/ Mann-Whitney/ Regressão logística	Um CAR mais positivo foi associado a um menor risco de desenvolvimento motor fino não ideal (OR por Inclinação 1-SD: 0,74, IC 95%: 0,57-0,96, p = 0,03), e um menor risco de atraso no desenvolvimento cognitivo não verbal (OR por 1-SD CAR: 0,58, IC 95%: 0,38-0,90, p = 0,02).
Andiarena, A. 2017 (Espanha - Europa)	186	Avaliação do desenvolvimento cognitivo e psicomotor (Escala McCarthy de habilidades infantis (MSCA)- 4 anos)	Saliva criança - imunoensaio enzimático	Regressão linear multivariada	Em meninos os níveis de cortisol foram negativamente associados ao desenvolvimento socioemocional [comportamentos autistas: Razão da Taxa de Incidência (IRR) = 1,6, p = 0,039; IC de 95% = 1,01 a 2,41].

Autor, ano, país	Amostra (N)	Desfecho principal (Instrumento de avaliação-idade)	Medida de cortisol (Amostra-método)	Estatística	Resultados
Haselbeck, C. 2017 (Alemanha – Europa)	49	Desenvolvimento motor e cognitivo (Teste Entwicklungstest ET 6-6 e Escala de Bayley- 16 meses)	Saliva materna e criança - cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa	Correlações (r de Pearson)	Bebês cujas mães tiveram maior sofrimento pré-natal expressaram um temperamento mais difícil e menor desenvolvimento motor fino aos 16 meses. Nenhuma associação pôde ser mostrada entre sofrimento materno pré-natal e cortisol salivar infantil.
Osborne, S. 2018 (UK - Europa)	106	Função e desenvolvimento neurocomportamental (Escala de Bayley de Desenvolvimento Infantil aos 12 meses)	Saliva materna e criança - imunoenensaio enzimático	Modelo Linear Geralizado (GLM)	Biomarcadores inflamatórios maternos e os níveis de cortisol foram correlacionados com a resposta ao estresse do bebê, sugerindo uma ligação mecanicista.

Autor, ano, país	Amostra (N)	Desfecho principal (Instrumento de avaliação-idade)	Medida de cortisol (Amostra-método)	Estatística	Resultados
Haquin-Macari, G. 2019 (Chile - América)	42	Atraso do desenvolvimento psicomotor (Teste de desenvolvimento psicomotor: ASQ-3 (em cinco domínios: comunicação, bom habilidades motoras, habilidades motoras grossas, resolução de problemas e relações interpessoais)- <2 anos)	Saliva materna e criança - radioimunoensaio	Testes Fisher e Mann-Whitney	O déficit do desenvolvimento psicomotor: foi de 2,3% e 28,5% entre as crianças dos grupos comparados, mas não tiveram diferença estatística ($p = 0,06$).

11 ANEXOS

Anexo 1: Parecer do CEP: Deficiência Intelectual em uma Coorte de Nascimentos: Investigação através do Sequenciamento de Exoma.

**UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Deficiência Intelectual em uma Coorte de Nascimentos: Investigação através do Sequenciamento de Exoma

Pesquisador: Luciana Tovo Rodrigues

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 85708318.6.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.426.180

Apresentação do Projeto:

As doenças genéticas, muitas vezes associadas ao atraso no desenvolvimento infantil, apesar de raras individualmente, são frequentes em seu conjunto, somando 5000 traços gênicos, anomalias cromossômicas e doenças multifatoriais. Cerca de 3% dos recém-nascidos apresentam defeitos congênitos (incluindo causas genéticas e não genéticas) e um número adicional apresenta doenças genéticas graves que irão manifestar-se mais tardiamente. Estudos de coorte em países desenvolvidos têm contribuído enormemente para que se possa entender as consequências, a longo prazo, das condições iniciais de vida. Fora desses países, tais estudos são raros. Este estudo se propõe a prosseguir avaliando uma coorte de crianças com deficiência intelectual (DI) de etiologia não esclarecida, acompanhadas desde o nascimento. Tais crianças já passaram por extensa avaliação genético clínica, exames laboratoriais, como por exemplo, citogenéticos e moleculares e testagem de QI. Além disso, dispomos de farta quantidade de informação cobrindo a gestação, o parto e os primeiros anos de vida, aliando o estudo clínico e laboratorial do problema, com as condições sócio-demográficas, estilo de vida dos pais, gestação, características do parto, morbidade ao longo dos primeiros anos de vida e escolaridade. Alguns estudos já esclareceram a frequência de ocorrência da DI e de suas causas na Coorte 2004. O aconselhamento genético para as famílias nos casos confirmados de

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Continuação do Parecer: 3.426.180

doenças genéticas e a adequada orientação e monitoramento a todos os casos avaliados foram oferecidos. Assim, um novo acompanhamento para aqueles cuja causa ainda não foi esclarecida seria benéfico. A reavaliação periódica nos casos de DI sem etiologia esclarecida segue recomendações previamente estabelecidas. A investigação laboratorial por meio do sequenciamento de exoma está incluída nas recomendações. Porém, estudos de coorte de DI utilizando tal técnica são raros. Este projeto tem como objetivo reavaliar pacientes com DI sem etiologia definida pertencentes à Coorte 2004 e seus pais, buscando identificar mutações de novo, como causa da DI.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Reavaliar pacientes com DI sem etiologia definida pertencentes à Coorte 2004 e seus pais, buscando identificar mutações de novo, como causa da DI.

Objetivos Secundários:

1. Investigar a etiologia da DI através de sequenciamento de exoma completo em pacientes selecionados, previamente avaliados através de avaliação clínica (genética e pediátrica) e laboratorial (bioquímica, citogenética e molecular);
2. Reavaliar os indivíduos afetados e seus pais;
3. Coletar material biológico dos pais destes indivíduos e realizar o sequenciamento do exoma para viabilizar a investigação biológica, ou seja, identificar mutações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue pode representar um pequeno desconforto para obtenção de material biológico. Tudo é feito com a máxima higiene. Será utilizado um conjunto de materiais exclusivamente para cada pessoa. Nada será reutilizado.

Benefícios:

O estudo trará benefícios diretos à família do participante, uma vez que poderá esclarecer a causa da deficiência intelectual. Muitas vezes identificando a causa, se pode orientar melhor a família, a escola e outros médicos que acompanham o participante. Além disso, se identificado um problema genético, também serão dadas orientações e poderá ser eliminada a chance de o mesmo problema se repetir na família.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda de um projeto aprovado anteriormente pelo CEP/FAMED, com o objetivo

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS**

Continuação do Parecer: 3.426.180

de solicitar a alteração da fonte de material biológico a ser coletado previsto no protocolo de pesquisa supracitado. Adicionalmente, a coleta não foi realizada aos 11-12 anos de idade por falta de recursos. Deseja-se, assim, alterar a idade para a coleta. A população alvo deste estudo se compõe de adolescentes, atualmente com 14-15 anos de idade, apresentando deficiência intelectual (DI) e largamente investigadas cuja causa da DI não foi esclarecida. Tais crianças são acompanhadas desde o nascimento e fazem parte de um estudo maior: a Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas (RS). Justificativa O estudo da DI em uma abordagem epidemiológica não é muito comum. Nosso estudo se propõe a prosseguir avaliando uma coorte de crianças com DI de etiologia não esclarecida, acompanhadas desde o nascimento. Tais crianças já passaram por extensa avaliação genético clínica, exames laboratoriais, como por exemplo, citogenéticos e moleculares e testagem de QI.

Além disso, dispomos de farta quantidade de informação cobrindo a gestação, o parto e os primeiros anos de vida, aliando o estudo clínico e laboratorial do problema, com as condições sócio-demográficas, estilo de vida dos pais, gestação, características do parto, morbidade ao longo dos primeiros anos de vida e escolaridade. O aconselhamento genético para as famílias nos casos confirmados de doenças genéticas e a adequada orientação e monitoramento a todos os casos avaliados foram oferecidos. Assim, um novo acompanhamento para aqueles cuja causa ainda não foi esclarecida seria benéfico. A reavaliação periódica nos casos de DI sem etiologia esclarecida segue recomendações previamente estabelecidas [Curry et al, 1997; Shevell M et al, 2003]. A investigação laboratorial por meio do sequenciamento de exoma está incluída nas recomendações. Porém, estudos de coorte de DI utilizando tal técnica são raros. A presente emenda se propõe a solicitar a alteração do tipo de material biológico fonte de DNA para o sequenciamento de exoma. Pretende-se coletar sangue venoso ao invés de saliva, como estava previsto no protocolo de pesquisa aprovado. Tal alteração metodológica está centrada no fato de leucócitos fornecerem DNA de melhor qualidade, menos degradado e menos contaminado por proteínas, e em maior quantidade que a saliva, o que é a situação ideal para obtenção de dados mais confiáveis fornecidos pelo sequenciamento de DNA. O sangue venoso será coletado do participante e de seus pais biológicos por enfermeiro ou técnico em enfermagem durante a visita do acompanhamento de 15 anos da coorte de 2004, que ocorrerá entre outubro de 2019 a julho de 2020. Após a coleta, o DNA será extraído por meio da técnica de "salting out", como procedimento padrão do laboratório do Centro de Pesquisas Epidemiológicas. As amostras serão armazenadas a -80°C nos freezers que constituem o atual biorrepositório das coortes de nascimentos de Pelotas, localizado no laboratório da sede do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da UFPEL. Após, será

Endereço: Av Duque de Caxias 250	
Bairro: Fragata	CEP: 96.030-001
UF: RS	Município: PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960	Fax: (53)3221-3554
	E-mail: cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS**

Continuação do Parecer: 3.426.180

realizado o sequenciamento dos trios em laboratório colaborador da pesquisa com expertise na metodologia. Para a realização de tal procedimento, o TCLE do estudo foi reformulado e encontra-se em anexo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado.

TCLE para registro fotográfico adequado.

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Pesquisa relevante para o estudo genético de causas de Deficiência Intelectual.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1382629_E1.pdf	19/06/2019 00:15:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_emenda.docx	19/06/2019 00:12:30	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	auto_registro_fotografico.pdf	06/03/2018 11:01:01	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_DI_CEPFAMED.pdf	06/03/2018 10:59:38	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	Luciana_folhaderosto.pdf	06/03/2018 10:59:22	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS

Continuação do Parecer: 3.426.180

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 29 de Junho de 2019

Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador(a))

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

Anexo 2: Parecer do CEP: Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004: Acompanhamento dos 15 anos de idade.

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004: Acompanhamento dos 15 anos de idade

Pesquisador: Luciana Tovo Rodrigues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 20183419.1.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.676.783

Apresentação do Projeto:

Os estudos de coorte de nascimentos envolvem a definição de um grupo de nascidos vivos em determinado período de tempo e incluem o monitoramento de saúde dos participantes ao longo de suas vidas. Apesar do alto custo destes estudos e do tempo que é necessário para que determinados resultados estejam disponíveis, sua importância é crescente e vem do reconhecimento de que muitos dos problemas que afetam a vida adulta têm sua origem no início da vida, incluindo a gestação (Barker DJ, 1999; Kuh D, 2003). Apenas estudos que consigam coletar dados ao longo da vida terão informação em qualidade e quantidade suficientes para explorar estas questões. Nesse contexto, apresentamos uma proposta de investigação científica que contempla as atividades a serem conduzidas no acompanhamento dos 15 anos de idade da Coorte de Nascimentos de 2004, que focalizam temas de alta prioridade, ligados à saúde do adolescente: precursores das doenças crônicas do adulto e composição corporal, incluindo a epidemia de obesidade. O projeto aborda também aspectos essenciais para a saúde integral (física e mental) e avaliará os determinantes precoces da saúde na adolescência. Os desfechos principais incluem a nutrição, composição corporal, precursores de doenças crônicas complexas, saúde física e mental, sono, nível crônico de estresse, violência doméstica e ambiental e capital humano.

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Continuação do Parecer: 3.676.783

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar e descrever as condições dos integrantes da coorte de nascimentos em Pelotas no ano de 2004, no ano em que completam 15 anos de idade, em relação à nutrição, composição corporal, saúde física e mental, sono, nível crônico de estresse e violência doméstica e ambiental.

Objetivos Secundários:

- 1) Investigar os determinantes de consumo alimentar e da composição corporal.
- 2) Estudar os fatores associados a saúde física e mental.
- 3) Avaliar os níveis de estresse crônico medido por cortisol capilar em adolescentes e examinar seus determinantes.
- 4) Estudar os fatores associados a violência doméstica e ambiental.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos do estudo são mínimos. O estudo não envolve riscos para a saúde do participante. Porém, iremos fazer muitas perguntas e pode ser que algumas delas possam deixar o participante pouco à vontade. Se houver qualquer desconforto, o participante poderá deixar de responder qualquer pergunta que desejar ou interromper a participação

Benefícios:

Os benefícios do projeto serão indiretos. Os resultados poderão servir de base para programas visando prevenir doenças comuns na fase adulta, como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças mentais, tumores, entre outras. Resultados que possam ter interesse para o indivíduo ou importância prática para a vida diária (peso, altura, IMC, percentual de gordura corporal, pressão arterial e circunferência da cintura, quadril e da coxa) serão fornecidos diretamente ao adolescente ou ao seu responsável ao finalizar a entrevista.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda de um projeto aprovado anteriormente pelo CEP/FAMED, com o objetivo de incluir de dois instrumentos de pesquisa no estudo. A primeira, refere-se a questões de papéis de gênero na sociedade, composta por 20 questões, a serem aplicadas aos adolescentes, presentes no questionário confidencial. Cada vez mais nossa sociedade tem tomado consciência da importância de se entender e progredir em termos de igualdade de gênero no Brasil. Temos registro de desigualdade importantes do ponto de vista de remuneração,

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Continuação do Parecer: 3.676.783

com as mulheres percebendo salários significativamente mais baixos que os homens, muita baixa presença feminina na representação política e um quadro muito preocupante em relação à violência relacionada a gênero e feminicídios. Em vista disso, é essencial conhecer melhor como nossos adolescentes percebem os papéis sociais de homens e mulheres, suas responsabilidades e a aceitabilidade da violência. Assim, incluímos no questionário a ser respondido de forma anônima pelos adolescentes sobre papéis de gênero para aprofundar nosso conhecimento sobre esta questão. Ainda, no questionário confidencial do adolescente, em virtude da popularização do uso de cigarros eletrônicos em nível mundial, optou-se por incluir questões referentes a isso. O segundo grupo de questões a serem incluídas refere-se a questões de uso de substâncias psicoativas, aplicado às mães dos adolescentes, por meio do instrumento ASSIT em um questionário confidencial, não previsto no protocolo original (Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test, APÊNDICE 2). Este instrumento foi desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e tem o objetivo de detectar o uso de álcool, tabaco e outras substâncias psicoativas. Este instrumento foi traduzido para várias línguas, inclusive para o português falado no Brasil, já tendo sido testado quanto à sua confiabilidade e factibilidade (WHO, 2002).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1460105_E1.pdf	27/10/2019 12:04:10		Aceito
Outros	emenda_CEP_27102019_ltr.pdf	27/10/2019 12:03:10	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	protocoloemenda.pdf	27/10/2019 12:02:48	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_emenda.pdf	27/10/2019 11:42:41	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS**

Continuação do Parecer: 3.676.783

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEsemanexo.pdf	23/08/2019 17:11:44	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoluciana.PDF	23/08/2019 14:01:16	Luciana Tovo Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 01 de Novembro de 2019

**Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador(a))**

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

Anexo 3: Metodologia para coleta e aferição do cortisol capilar.

MANUAL PARA COLETA DE CABELO COORTE 2004 **Acompanhamento 15 anos (2019-2020)**

→ Instruções de coleta para o PARTICIPANTE

1. Explicar a coleta ao participante. Deixar claro que:

Você precisará coletar aproximadamente uma quantidade equivalente ao diâmetro de um lápis da região da cabeça conhecida como “coroa”, conforme figura 1 abaixo:



Figura 1

2. Pedir ao participante que fique sentada(o) em uma cadeira.

→ Em caso de recusa ou questionamentos sobre o corte de cabelo, mostrar a quantidade de cabelo que será coletado usando o mostruário e tentar reverter a recusa.

→ INSTRUÇÕES DOS PROCEDIMENTOS DE COLETA

→ Descrição do material de coleta

1. Tesoura
2. Folhas papel toalha
3. Álcool 70%
4. Clipe de escritório (1)
5. Etiquetas de identificação do participante
6. Medidor de coleta
7. Lixo contaminado
8. Secador de cabelo
9. KIT de coleta

→ Descrição do kit de coleta

1. Saco Ziplock
2. Cartão de papel
3. Papel toalha
4. Pente e clipes de cabelo (2)

5. Clipe de escritório (1)

6. Barbante

➔ **Organização do Material**

- Em uma mesa, organizar o kit de coleta;
- Abrir o kit de coleta na frente do participante a ser coletado. A coleta será feita apenas no adolescente;
- Registrar no caderno de campo a coleta;
- Iniciar o preenchimento da folha de coleta;
- Higienizar a tesoura de coleta de cabelo na frente do participante;
- Identificar o material de coleta com a etiqueta contendo o ID e nome do participante a ser coletado;
- Abrir o cartão de armazenamento do cabelo cortado.

Você precisará coletar aproximadamente uma quantidade equivalente ao diâmetro de um lápis coletados **SOMENTE** da região da cabeça conhecida como “coroa”, conforme figura 2 abaixo.

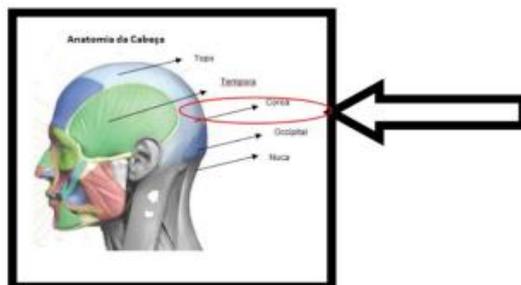


Figura 2

PASSO A PASSO PARA A REALIZAÇÃO DA COLETA DO CABELO

A) O participante deve estar sentado perto da mesa do coletador. Posicionar-se atrás do participante, a fim de tirar a amostra da “coroa” posterior da cabeça (figura 3). Não coletar cabelo da parte superior da cabeça; os níveis de cortisol são diferentes e queremos garantir a padronização das amostras. Se o cabelo estiver molhado, usar o secador de cabelo.



Figura 3

B) Higienizar as mãos antes da coleta.

C) Na parte de trás da cabeça, traçar uma linha imaginária acima da ponta da orelha, separar o cabelo e o prender com um clipe acima da área a ser coletada se o participante tiver cabelo longo;

D) Selecionar a mecha de cabelo a ser coletada, torcer o feixe de cabelo se possível, usar o medidor de cabelo para verificar a quantidade adequada de cabelo, enlaçar a mecha com o barbante e ajustar para cortar o cabelo o mais rente possível do couro cabeludo (lado das raízes) com a tesoura sem ponta.

ATENÇÃO! Para ajudar na quantidade necessária da coleta de cabelo, utilizar o cartão coletor para medir, abrindo-o e colocando a mecha selecionada no orifício (Figura 4).



Figura 4

INSTRUÇÕES PARA CORTE DE CABELO DE DIFERENTES TAMANHOS

➤ **Se o cabelo for curto:**

Se o cabelo a ser coletado tiver menos que 3,0 cm, a quantidade de cabelo deverá ser o dobro da sugerida para coleta. O cabelo poderá ser coletado de diversos pontos para prevenir falhas esteticamente indesejáveis.

Utilizar o pente na linha imaginária para ajudar no corte da mecha de cabelo. Usar um pente para levantar o cabelo, colocar a tesoura perto do couro cabeludo e cortar duas ou três vezes seguindo a linha imaginária. Usar o cartão de coleta para sustentar os fios que estão sendo cortados. O corte deve ser feito transversalmente, não no formato de mecha.

OBS.: O cartão de coleta contém a medida de 3,0 cm impresso para indicar o tamanho da mecha do cabelo a ser cortado.

➤ **Se o cabelo for muito curto:**

Se cabelo for muito curto: Seguir o corte natural da nuca ou das laterais, conforme o corte do cabelo do participante de maneira a não prejudicar a estética.

OBS.: Cortar o cabelo diretamente no cartão de papel.

E) Uma vez que a amostra de cabelo foi coletada, colocar os fios de cabelo no meio do cartão, cuidando para que a ponta do cabelo mais próxima da raiz (ou couro cabeludo) fique voltada para a direção da seta, ao longo da linha pontilhada, e fechar o cartão;

OBS: o cartão contém a indicação da direção correta que o cabelo deve ser armazenado.

F) Fixar a amostra de cabelo no cartão dobrado, utilizando o clipe de escritório.

G) Colocar o cartão identificado no saco Ziplock e selar o saco;

H) Oferecer o pente e o grampo de cabelo utilizado ao participante caso queira levar para a casa. Se ele(a) não quiser, descartar no lixo contaminado;

I) Descartar os papéis utilizados na higienização das tesouras no lixo contaminado;

J) Higienizar as mãos depois da coleta.

➤ **FINALIZAÇÃO**

Preencher a folha de coleta respondendo as questões e adicionar as observações de coleta, como tamanho de cabelo, dificuldades, imprevisto ou qualquer informação não prevista no protocolo que julgue relevante para o procedimento. Indicar com um "X" no esquema o local onde foi coletada a amostra.

Não se esqueça de registrar a coleta no REDCap.

**LEVAR A AMOSTRA IDENTIFICADA E FICHA DE COLETA
CORRETAMENTE PREENCHIDA NA RECEPÇÃO DEIXANDO NA
CAIXA DE COLETA DE AMOSTRAS**



COORTE 2004 - 15 anos (2019) – COLETA DE CABELO

- 1) ID: _____
- 2) Nome da Entrevistadora : _____
- 3) Nome do participante: _____
- 4) Data da coleta: ____/____/____ 5) Horário de início da coleta de cabelo ____:____
- 6) Coleta: **(1) OK (2) PERDA (3) RECUSA**
- 7) Observações sobre a coleta do cabelo:

- 8) O cabelo estava oleoso? (0) Não (1) Sim (2) Não sei
- 9) O cabelo tinha alguma química (mesmo que não tenha sido relatado)? (0) Não (1) Sim (2) Não Sei
- 10) O cabelo tinha piolho? (0) Não (1) Sim (2) Não sei
- 11) O cabelo tinha lêndea? (0) Não (1) Sim (2) Não Sei

Laboratório (Preenchimento EXCLUSIVO no laboratório)

() Curto () Curto/pouco () Comprido ()
 Comprido/pouco

Observações:

CORTE DE CABELO

Medir com uma régua 3cm de cabelo (extremidade do couro cabelo/ponta final do cabelo), cortar a amostra de cabelo e guardar no tubo já identificado para aguardar a etapa de lavagem.

LAVAGENS

Lavagem 1

- 1) Adicionar 12 mL de isopropanol no tubo falcon com a amostra de cabelo;
- 2) Inverter manualmente o tubo falcon por 2 minutos;
- 3) Deixar o cabelo no fundo do tubo e descartar o isopropanol sem perder a amostra de cabelo.

Lavagem 2

- 1) Adicionar 12 mL de isopropanol no tubo falcon com a amostra de cabelo;
- 2) Inverter manualmente o tubo falcon por 2 minutos;
- 3) Retirar a tampa e higienizar a parte superior do tubo falcon;
- 4) Deixar o tubo falcon aberto por 48 horas para secar (protegido por tenda de papel alumínio);
- 5) Após as 48hs, triturar a amostra de cabelo do tubo falcon.

MOAGEM DO CABELO

- 1) Colocar 4 bolas na extremidade mais rasa do tubo da moagem e a amostra de cabelo na extremidade mais funda do tubo;
- 2) Utilizar uma pinça para retirar amostra de cabelo do tubo falcon para o tubo da moagem;
- 3) Limpar todo material com etanol entre as amostras (inclusive a borracha de vedação);
- 4) Colocar a amostra no Cryomill e deixar correr por 3 minutos na frequência de 25 Hz;
- 5) Remover o tubo da moagem do equipamento Cryomill, bater na superfície em ambos os lados do frasco (FECHADO) por 2 minutos para soltar partículas de cabelo das paredes do mesmo;
- 6) Pesar e zerar o papel da moagem (papel alumínio);
- 7) Depositar o cabelo moído, no papel da pesagem (papel alumínio);
- 8) Abra o tubo com a ponta rasa no topo;
- 9) Usar colher e pincel para retirar todo o pó de cabelo do papel;
- 10) Bater o papel de pesagem na balança, pesar o cabelo em pó para que fique entre 0,03 e 0,035 g (registre o valor real) (descarte o pó restante se houver);
- 11) Depositar no tubo eppendorf de 2,0 mL o pó de cabelo;
- 12) Adicionar 1,0 mL de álcool absoluto + pó de cabelo, agitar o tubo;
- 13) Colocar o tubo eppendorf máquina Mix-All - ajuste a 22 rpm por 48h.

EXTRAÇÕES

Primeira Extração das amostras

- 1) Passar as amostras no vortex por 2-3 segundos,
- 2) Centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos; ao remover da centrífuga, deve se formar um pellet no tubo
- 3) Enquanto os tubos estão na centrífuga, dispor novos tubos eppendorf de 2,0 mL para pipetar o sobrenadante do tubo prévio *;
- 4) Pipetar 800 µL do sobrenadante no tubo identificado (novo)*

- 5) Deixar os tubos com o sobrenadante* aberto, secando de 24-48 horas para garantir a evaporação completa do solvente;
- 6) Adicionar 1,0 mL de álcool absoluto aos tubos originais que continham o pellet, agitar para misturar;
- 7) Colocar o tubo original com pellet +álcool no agitador por outras 48horas.

Segunda Extração de sobrenadante

- 8) Passar as amostras que estavam no agitador overnight (original) no vortex por 2-3 segundos,
- 9) Centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos;
- 10) Pipetar 1000 μ L do sobrenadante para o microtubo com o asterico*;
- 11) Secar tubos de 24-48 horas para garantir a evaporação completa do solvente
- 12) Eluir a amostra em 150 μ L tampão laranja Salimetrics (diluyente do ensaio);
- 13) Passar vórtex nas amostras (5 segundos) até que esteja totalmente dissolvida;
- 14) Deixar descansar por 24 horas;
- 15) Antes do ensaio, centrifugar a amostra 2.800 rpm durante 10 minutos.

12 REFERÊNCIAS

- Alazami, A. M., N. Patel, H. E. Shamseldin, S. Anazi, M. S. Al-Dosari, F. Alzahrani, H. Hijazi, M. Alshammari, M. A. Aldahmesh, M. A. Salih, E. Fageih, A. Alhashem, F. A. Bashiri, M. Al-Owain, A. Y. Kentab, S. Sogaty, S. Al Tala, M.-H. Temsah, M. Tulbah, R. F. Aljelaify, S. A. Alshahwan, M. Z. Seidahmed, A. A. Alhadid, H. Aldhalaan, F. AlQallaf, W. Kurdi, M. Alfadhel, Z. Babay, M. Alsogheer, N. Kaya, Z. N. Al-Hassnan, G. M. H. Abdel-Salam, N. Al-Sannaa, F. Al Mutairi, H. Y. El Khashab, S. Bohlega, X. Jia, H. C. Nguyen, R. Hammami, N. Adly, J. Y. Mohamed, F. Abdulwahab, N. Ibrahim, E. A. Naim, B. Al-Younes, B. F. Meyer, M. Hashem, R. Shaheen, Y. Xiong, M. Abouelhoda, A. A. Aldeeri, D. M. Monies, e F. S. Alkuraya. 2015. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Reports* 10:148–161.
- Alvarado, M. F. T. 2017. Análisis comparativo de cortisol en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, discapacidad intelectual y un grupo control. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual/Latin American Journal of Behavioral Medicine* 7:89–95.
- American Association on Mental Retardation, 2002. 2006. Retardo Mental. Definição, classificação e sistemas de apoio. 10a edição. Artmed, Porto Alegre.
- American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fifth Edition. American Psychiatric Association.
- Anderson, N. B. 1998. Levels of analysis in health science. A framework for integrating sociobehavioral and biomedical research. *Annals of the New York Academy of Sciences* 840:563–576.
- Andiarena, A., N. Balluerka, M. Murcia, J. Ibarluzea, V. Glover, e O. Vegas. 2017. Evening salivary cortisol and alpha-amylase at 14months and neurodevelopment at 4years: Sex differences. *Hormones and behavior* 94:135–144.
- Arvio, M., e M. Sillanpää. 2003. Prevalence, aetiology and comorbidity of severe and profound intellectual disability in Finland. *Journal of intellectual disability research: JIDR* 47:108–112.
- Baird, P. A., e A. D. Sadovnick. 1985. Mental retardation in over half-a-million consecutive livebirths: an epidemiological study. *American Journal of Mental Deficiency* 89:323–330.
- Bamshad, M. J., S. B. Ng, A. W. Bigham, H. K. Tabor, M. J. Emond, D. A. Nickerson, e J. Shendure. 2011. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews. Genetics* 12:745–755.
- Barker, D. J. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science (London, England: 1979)* 95:115–128.
- Barker, D. J. P. 2002. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13:364–368.
- Barros, A. J. D., I. da S. dos Santos, C. G. Victora, E. P. Albernaz, M. R. Domingues, I. K. Timm, A. Matijasevich, A. D. Bertoldi, e F. C. Barros. 2006. Coorte de nascimentos de Pelotas, 2004: metodologia e descrição. *Revista de Saúde Pública* 40:402–413.

- Bayani, J., e J. A. Squire. 2004. Traditional banding of chromosomes for cytogenetic analysis. *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 22:Unit 22.3.
- Bergman, K., V. Glover, P. Sarkar, D. H. Abbott, e T. G. O'Connor. 2010. In utero cortisol and testosterone exposure and fear reactivity in infancy. *Hormones and behavior* 57:306–312.
- Bernardini, L., V. Alesi, S. Loddo, A. Novelli, I. Bottillo, A. Battaglia, M. C. Digilio, G. Zampino, A. Ertel, P. Fortina, S. Surrey, e B. Dallapiccola. 2010. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *European journal of human genetics: EJHG* 18:178–185.
- Blomqvist, M., K. Holmberg, F. Lindblad, E. Fernell, U. Ek, e G. Dahllöf. 2007. Salivary cortisol levels and dental anxiety in children with attention deficit hyperactivity disorder. *European Journal of Oral Sciences* 115:1–6.
- Bowdin, S., A. Gilbert, E. Bedoukian, C. Carew, M. P. Adam, J. Belmont, B. Bernhardt, L. Biesecker, H. T. Bjornsson, M. Blitzer, L. C. A. D'Alessandro, M. A. Deardorff, L. Demmer, A. Elliott, G. L. Feldman, I. A. Glass, G. Herman, L. Hindorff, F. Hisama, L. Hudgins, A. M. Innes, L. Jackson, G. Jarvik, R. Kim, B. Korf, D. H. Ledbetter, M. Li, E. Liston, C. Marshall, L. Medne, M. S. Meyn, N. Monfared, C. Morton, J. J. Mulvihill, S. E. Plon, H. Rehm, A. Roberts, C. Shuman, N. B. Spinner, D. J. Stavropoulos, K. Valverde, D. J. Waggoner, A. Wilkens, R. D. Cohn, e I. D. Krantz. 2016. Recommendations for the integration of genomics into clinical practice. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 18:1075–1084.
- Braaten, E. B., e D. Norman. 2006. Intelligence (IQ) testing. *Pediatrics in Review* 27:403–408.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment--United States, 2003. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 53:57–59.
- Choi, M., U. I. Scholl, W. Ji, T. Liu, I. R. Tikhonova, P. Zumbo, A. Nayir, A. Bakkaloğlu, S. Ozen, S. Sanjad, C. Nelson-Williams, A. Farhi, S. Mane, e R. P. Lifton. 2009. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:19096–19101.
- Corrêa, M. V. 2002. O admirável Projeto Genoma Humano. *Physis: Revista de Saúde Coletiva* 12:277–299.
- Costa, J. S. D. da, e C. G. Victora. 2006. O que é “um problema de saúde pública”? *Revista Brasileira de Epidemiologia* 9:144–146.
- Croen, L. A., J. K. Grether, e S. Selvin. 2001. The epidemiology of mental retardation of unknown cause. *Pediatrics* 107:E86.
- Davis, E. P., e C. A. Sandman. 2010. The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child development* 81:131–148.
- Deciphering Developmental Disorders Study. 2017. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* 542:433–438.
- Diários Jusbrasil. 2019. Diário Oficial da União. www.jusbrasil.com.br/diarios/234930819/dou-seção-1-29-03-2019-pg-98.
- Durkin, M. S., N. Z. Khan, L. L. Davidson, S. Huq, S. Munir, E. Rasul, e S. S. Zaman. 2000. Prenatal and postnatal risk factors for mental retardation

- among children in Bangladesh. *American Journal of Epidemiology* 152:1024–1033.
- Edwards, C. 2012. Sixty years after Hench--corticosteroids and chronic inflammatory disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97:1443–1451.
- Edwards, S., A. Clow, P. Evans, e F. Hucklebridge. 2001. Exploration of the awakening cortisol response in relation to diurnal cortisol secretory activity. *Life Sciences* 68:2093–2103.
- Elmas, M., H. Yıldız, M. Erdoğan, B. Gogus, K. Avcı, e M. Solak. 2018. Comparison of clinical parameters with whole exome sequencing analysis results of autosomal recessive patients; a center experience. *Molecular Biology Reports* 46:287–299.
- Elmas, M., H. Yıldız, M. Erdoğan, B. Gogus, K. Avcı, e M. Solak. 2019. Comparison of clinical parameters with whole exome sequencing analysis results of autosomal recessive patients; a center experience. *Molecular biology reports* 46:287–299.
- Farwell, K. D., L. Shahmirzadi, D. El-Khechen, Z. Powis, E. C. Chao, B. Tippin Davis, R. M. Baxter, W. Zeng, C. Mroske, M. C. Parra, S. K. Gandomi, I. Lu, X. Li, H. Lu, H.-M. Lu, D. Salvador, D. Ruble, M. Lao, S. Fischbach, J. Wen, S. Lee, A. Elliott, C. L. M. Dunlop, e S. Tang. 2015. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 17:578–586.
- Fedurco, M., A. Romieu, S. Williams, I. Lawrence, e G. Turcatti. 2006. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research* 34:e22.
- Fieremans, N., H. Van Esch, M. Holvoet, G. Van Goethem, K. Devriendt, M. Rosello, S. Mayo, F. Martinez, S. Jhangiani, D. M. Muzny, R. A. Gibbs, J. R. Lupski, J. R. Vermeesch, P. Marynen, e G. Froyen. 2016. Identification of Intellectual Disability Genes in Female Patients with a Skewed X-Inactivation Pattern. *Human Mutation* 37:804–811.
- Flynn, J. R. 2013. *Intelligence and human progress: The story of what was hidden in our genes*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, US.
- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. Censo demográfico 2010: Características gerais da população. Rio de Janeiro: IBGE, 2010 (<http://www.censo2010.ibge.gov.br>).
- Gilissen, C., J. Y. Hehir-Kwa, D. T. Thung, M. van de Vorst, B. W. M. van Bon, M. H. Willemsen, M. Kwint, I. M. Janssen, A. Hoischen, A. Schenck, R. Leach, R. Klein, R. Tearle, T. Bo, R. Pfundt, H. G. Yntema, B. B. A. de Vries, T. Kleefstra, H. G. Brunner, L. E. L. M. Vissers, e J. A. Veltman. 2014. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511:344–347.
- González, G., V. Raggio, M. Boidi, A. Tapié, e L. Roche. 2013. [Advances in the identification of the aetiology of mental retardation]. *Revista De Neurologia* 57 Suppl 1:S75-83.
- Grozeva, D., K. Carss, O. Spasic-Boskovic, M.-I. Tejada, J. Gecz, M. Shaw, M. Corbett, E. Haan, E. Thompson, K. Friend, Z. Hussain, A. Hackett, M. Field, A. Renieri, R. Stevenson, C. Schwartz, J. A. B. Floyd, J. Bentham, C. Cosgrove, B. Keavney, S. Bhattacharya, Italian X-linked Mental

- Retardation Project, UK10K Consortium, GOLD Consortium, M. Hurles, e F. L. Raymond. 2015. Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability. *Human Mutation* 36:1197–1204.
- Hagmann-von Arx, P., S. Lemola, e A. Grob. 2018. Does IQ = IQ? Comparability of Intelligence Test Scores in Typically Developing Children. *Assessment* 25:691–701.
- Hamdan, F. F., M. Srour, J.-M. Capo-Chichi, H. Daoud, C. Nassif, L. Patry, C. Massicotte, A. Ambalavanan, D. Spiegelman, O. Diallo, E. Henrion, A. Dionne-Laporte, A. Fougerat, A. V. Pshezhetsky, S. Venkateswaran, G. A. Rouleau, e J. L. Michaud. 2014. De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS genetics* 10:e1004772.
- Han, J. Y., e I. G. Lee. 2020. Genetic Tests by Next Generation Sequencing in Children with Developmental Delay and/or Intellectual disability. *Clinical and Experimental Pediatrics*.
- Haquin Macari, G., A. Gallardo Tapia, G. Iñiguez, e G. Weisstaub. 2019. [Psychomotor development and cortisol salivary levels in infants that live with their inmate mothers]. *Revista chilena de pediatria* 90:275–282.
- Harripaul, R., A. Noor, M. Ayub, e J. B. Vincent. 2017. The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7.
- Harripaul, R., N. Vasli, A. Mikhailov, M. A. Rafiq, K. Mittal, C. Windpassinger, T. I. Sheikh, A. Noor, H. Mahmood, S. Downey, M. Johnson, K. Vleuten, L. Bell, M. Ilyas, F. S. Khan, V. Khan, M. Moradi, M. Ayaz, F. Naeem, A. Heidari, I. Ahmed, S. Ghadami, Z. Agha, S. Zeinali, R. Qamar, H. Mozhdehipanah, P. John, A. Mir, M. Ansar, L. French, M. Ayub, e J. B. Vincent. 2018. Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Molecular Psychiatry* 23:973–984.
- Haselbeck, C., U. Niederberger, A. Kulle, K. Wache, E. Brauner, M. Gutermuth, P.-M. Holterhus, W.-D. Gerber, e M. Siniatchkin. 2017. Prenatal maternal distress seems to be associated with the infant's temperament and motor development: an explorative study. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 124:881–890.
- Heinzen, E. L., B. M. Neale, S. F. Traynelis, A. S. Allen, e D. B. Goldstein. 2015. The genetics of neuropsychiatric diseases: looking in and beyond the exome. *Annual Review of Neuroscience* 38:47–68.
- Hodgson, N., V. A. Freedman, D. A. Granger, e A. Erno. 2004. Biobehavioral correlates of relocation in the frail elderly: salivary cortisol, affect, and cognitive function. *Journal of the American Geriatrics Society* 52:1856–1862.
- Hu, H., K. Kahrizi, L. Musante, Z. Fattahi, R. Herwig, M. Hosseini, C. Oppitz, S. S. Abedini, V. Suckow, F. Larti, M. Beheshtian, B. Lipkowitz, T. Akhtarkhavari, S. Mehvari, S. Otto, M. Mohseni, S. Arzhang, P. Jamali, F. Mojahedi, M. Taghdiri, E. Papari, M. J. Soltani Banavandi, S. Akbari, S. H. Tonekaboni, H. Dehghani, M. R. Ebrahimpour, I. Bader, B. Davarnia, M. Cohen, H. Khodaei, B. Albrecht, S. Azimi, B. Zirn, M. Bastami, D. Wiczorek, G. Bahrami, K. Keleman, L. N. Vahid, A. Tzschach, J. Gärtner, G. Gillissen-Kaesbach, J. R. Varaghchi, B. Timmermann, F. Pourfatemi, A. Jankhah, W. Chen, P. Nikuei, V. M. Kalscheuer, M. Oladnabi, T. F.

- Wienker, H.-H. Ropers, e H. Najmabadi. 2019. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. *Molecular psychiatry* 24:1027–1039.
- Huang, J., T. Zhu, Y. Qu, e D. Mu. 2016. Prenatal, Perinatal and Neonatal Risk Factors for Intellectual Disability: A Systemic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11:e0153655.
- Huizink, A. C., P. G. Robles de Medina, E. J. H. Mulder, G. H. A. Visser, e J. K. Buitelaar. 2003. Stress during pregnancy is associated with developmental outcome in infancy. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 44:810–818.
- Jacobson, J. W., J. A. Mulick, e J. Rojahn. 2007. *Handbook of intellectual and developmental disabilities*. Springer Science & Business Media.
- Juruena, M. F., A. J. Cleare, e C. M. Pariante. 2004. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 26:189–201.
- Kahrizi, K., H. Hu, M. Hosseini, V. M. Kalscheuer, Z. Fattahi, M. Beheshtian, V. Suckow, M. Mohseni, B. Lipkowitz, S. Mehvari, Z. Mehrjoo, T. Akhtarkhavari, Z. Ghaderi, M. Rahimi, S. Arzhang, P. Jamali, M. Falahat Chian, P. Nikuei, F. Sabbagh Kermani, F. Sadeghinia, R. Jazayeri, S. H. Tonekaboni, A. Khoshaeen, H. Habibi, F. Pourfatemi, F. Mojahedi, M.-R. Khodaie-Ardakani, R. Najafipour, T. F. Wienker, H. Najmabadi, e H.-H. Ropers. 2019. Effect of inbreeding on intellectual disability revisited by trio sequencing. *Clinical Genetics* 95:151–159.
- Karam, S. M., A. J. D. Barros, A. Matijasevich, I. S. Dos Santos, L. Anselmi, F. Barros, S. Leistner-Segal, T. M. Félix, M. Riegel, S. W. Maluf, R. Giugliani, e M. M. Black. 2016. Intellectual Disability in a Birth Cohort: Prevalence, Etiology, and Determinants at the Age of 4 Years. *Public Health Genomics* 19:290–297.
- Karam, S. M., M. Riegel, S. L. Segal, T. M. Félix, A. J. D. Barros, I. S. Santos, A. Matijasevich, R. Giugliani, e M. Black. 2015. Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: A population-based study. *American Journal of Medical Genetics. Part a* 167:1204–1214.
- van Karnebeek, C. D. M., M. C. E. Jansweijer, A. G. E. Leenders, M. Offringa, e R. C. M. Hennekam. 2005. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *European journal of human genetics: EJHG* 13:6–25.
- Kaufman, L., M. Ayub, e J. B. Vincent. 2010. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2:182–209.
- Khan, M. A., S. Khan, C. Windpassinger, M. Badar, Z. Nawaz, e R. M. Mohammad. 2016. The Molecular Genetics of Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability: a Mutational Continuum and Future Recommendations. *Annals of human genetics* 80:342–368.
- King, T. L., A. Milner, Z. Aitken, A. Karahalios, E. Emerson, e A. M. Kavanagh. 2019. Mental health of adolescents: variations by borderline intellectual functioning and disability. *European child & adolescent psychiatry* 28:1231–1240.
- Knight, S. J., S. W. Horsley, R. Regan, N. M. Lawrie, E. J. Maher, D. L. Cardy, J. Flint, e L. Kearney. 1997. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects

- submicroscopic rearrangements involving telomeres. *European journal of human genetics: EJHG* 5:1–8.
- Ku, C.-S., E. K. Tan, e D. N. Cooper. 2013. From the periphery to centre stage: de novo single nucleotide variants play a key role in human genetic disease. *Journal of medical genetics* 50:203–211.
- Kuchay, R. A. H., Y. R. Mir, X. Zeng, A. Hassan, J. Musarrat, I. Parwez, C. Kernstock, A. Träschütz, e M. Synofzik. 2019. ARSACS as a Worldwide Disease: Novel SACS Mutations Identified in a Consanguineous Family from the Remote Tribal Jammu and Kashmir Region in India. *Cerebellum (London, England)* 18:807–812.
- Kurki, M. I., E. Saarentaus, O. Pietiläinen, P. Gormley, D. Lal, S. Kerminen, M. Tornaiainen-Holm, E. Hämäläinen, E. Rahikkala, R. Keski-Filppula, M. Rauhala, S. Korpi-Heikkilä, J. Komulainen-Ebrahim, H. Helander, P. Vieira, M. Männikkö, M. Peltonen, A. S. Havulinna, V. Salomaa, M. Pirinen, J. Suvisaari, J. S. Moilanen, J. Körkkö, O. Kuusmin, M. J. Daly, e A. Palotie. 2019. Contribution of rare and common variants to intellectual disability in a sub-isolate of Northern Finland. *Nature Communications* 10:410.
- Kvarnung, M., e A. Nordgren. 2017. Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1031:39–54.
- Kvarnung, M., F. Taylan, D. Nilsson, B.-M. Anderlid, H. Malmgren, K. Lagerstedt-Robinson, E. Holmberg, M. Burstedt, M. Nordenskjöld, A. Nordgren, e E. S. Lundberg. 2018. Genomic screening in rare disorders: New mutations and phenotypes, highlighting ALG14 as a novel cause of severe intellectual disability. *Clinical Genetics* 94:528–537.
- Lee, D. Y., E. Kim, e M. H. Choi. 2015. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB reports* 48:209–216.
- LeWinn, K. Z., L. R. Stroud, B. E. Molnar, J. H. Ware, K. C. Koenen, e S. L. Buka. 2009. Elevated maternal cortisol levels during pregnancy are associated with reduced childhood IQ. *International journal of epidemiology* 38:1700–1710.
- de Ligt, J., M. H. Willemsen, B. W. M. van Bon, T. Kleefstra, H. G. Yntema, T. Kroes, A. T. Vulto-van Silfhout, D. A. Koolen, P. de Vries, C. Gilissen, M. del Rosario, A. Hoischen, H. Scheffer, B. B. A. de Vries, H. G. Brunner, J. A. Veltman, e L. E. L. M. Vissers. 2012. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England Journal of Medicine* 367:1921–1929.
- Lupien, S. J., F. Maheu, M. Tu, A. Fiocco, e T. E. Schramek. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and Cognition* 65:209–237.
- Marieb, E. N., e K. Hoehn. 2007. The endocrine system. *Human Anatomy & Physiology Eighth Edition*; Beauparlant, S., Ed.; Benjamin Cummings:616–618.
- Maulik, P. K., M. N. Mascarenhas, C. D. Mathers, T. Dua, e S. Saxena. 2011. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities* 32:419–436.
- McKernan, K., A. Blanchard, L. Kotler, e G. Costa. 2008, janeiro 3. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing.
- McMullan, D. J., M. Bonin, J. Y. Hehir-Kwa, B. B. A. de Vries, A. Dufke, E. Rattenberry, M. Steehouwer, L. Moruz, R. Pfundt, N. de Leeuw, A. Riess,

- O. Altug-Teber, H. Enders, S. Singer, U. Grasshoff, M. Walter, J. M. Walker, C. V. Lamb, E. V. Davison, L. Brueton, O. Riess, e J. A. Veltman. 2009. Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Human Mutation* 30:1082–1092.
- McSherry, M., K. E. Masih, N. H. Elcioglu, P. Celik, O. Balci, F. B. Cengiz, D. Nunez, C. J. Sineni, S. Seyhan, D. Kocaoglu, S. Guo, D. Duman, G. Bademci, e M. Tekin. 2018. Identification of candidate gene FAM183A and novel pathogenic variants in known genes: High genetic heterogeneity for autosomal recessive intellectual disability. *PloS One* 13:e0208324.
- Megahed, H., M. Nicouleau, G. Barcia, D. Medina-Cano, K. Siquier-Pernet, C. Bole-Feysot, M. Parisot, C. Masson, P. Nitschké, M. Rio, N. Bahi-Buisson, I. Desguerre, A. Munnich, N. Boddaert, L. Colleaux, e V. Cantagrel. 2016. Utility of whole exome sequencing for the early diagnosis of pediatric-onset cerebellar atrophy associated with developmental delay in an inbred population. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11:57.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, e H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.
- Moeschler, J. B., e M. Shevell. 2014. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* 134:e903-918.
- Moeschler, J. B., M. Shevell, e American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. 2006. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 117:2304–2316.
- Monroe, G. R., G. W. Frederix, S. M. C. Savelberg, T. I. de Vries, K. J. Duran, J. J. van der Smagt, P. A. Terhal, P. M. van Hasselt, H. Y. Kroes, N. M. Verhoeven-Duif, I. J. Nijman, E. C. Carbo, K. L. van Gassen, N. V. Knoers, A. M. Hövels, M. M. van Haelst, G. Visser, e G. van Haften. 2016. Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional diagnostic trajectory in children with intellectual disability. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 18:949–956.
- Mormede, P., A. Foury, P. Barat, J.-B. Corcuff, E. Terenina, N. Marissal-Arvy, e M.-P. Moisan. 2011. Molecular genetics of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1220:127–136.
- Need, A. C., V. Shashi, K. Schoch, S. Petrovski, e D. B. Goldstein. 2017. The importance of dynamic re-analysis in diagnostic whole exome sequencing. *Journal of Medical Genetics* 54:155–156.
- Nemeroff, C. B. 1996. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Molecular Psychiatry* 1:336–342.
- Ng, S. B., E. H. Turner, P. D. Robertson, S. D. Flygare, A. W. Bigham, C. Lee, T. Shaffer, M. Wong, A. Bhattacharjee, E. E. Eichler, M. Bamshad, D. A. Nickerson, e J. Shendure. 2009. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461:272–276.
- Ohba, C., H. Osaka, M. Iai, S. Yamashita, Y. Suzuki, N. Aida, N. Shimozawa, A. Takamura, H. Doi, A. Tomita-Katsumoto, K. Nishiyama, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, Y. Eto, F. Tanaka, N. Matsumoto, e H. Saitsu.

- 2013a. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics* 14:225–232.
- Ohba, C., H. Osaka, M. Iai, S. Yamashita, Y. Suzuki, N. Aida, N. Shimozawa, A. Takamura, H. Doi, A. Tomita-Katsumoto, K. Nishiyama, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, Y. Eto, F. Tanaka, N. Matsumoto, e H. Saitsu. 2013b. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics* 14:225–232.
- Osborne, S., A. Biaggi, T. E. Chua, A. Du Preez, K. Hazelgrove, N. Nikkheslat, G. Previti, P. A. Zunszain, S. Conroy, e C. M. Pariante. 2018. Antenatal depression programs cortisol stress reactivity in offspring through increased maternal inflammation and cortisol in pregnancy: The Psychiatry Research and Motherhood - Depression (PRAM-D) Study. *Psychoneuroendocrinology* 98:211–221.
- Papenhausen, P., S. Schwartz, H. Risheg, E. Keitges, I. Gadi, R. D. Burnside, V. Jaswaney, J. Pappas, R. Pasion, K. Friedman, e J. Tepperberg. 2011. UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 155A:757–768.
- Pedroso, J. L., M. C. França Jr, S. Teixeira Camargos, O. G. Barsottini, e F. Kok. 2019. *Neurogenética na Prática Clínica*. Atheneu.
- Petterson, B., J. Bourke, H. Leonard, P. Jacoby, e C. Bower. 2007. Co-occurrence of birth defects and intellectual disability. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 21:65–75.
- Pfeifer, G. P., e P. Hainaut. 2011. Next-generation sequencing: emerging lessons on the origins of human cancer. *Current Opinion in Oncology* 23:62–68.
- Plomin, R. 1999. Genetics and general cognitive ability. *Nature* 402:C25-29.
- Presland, A. D., I. C. H. Clare, S. Broughton, L. Luke, E. Wheeler, G. Fairchild, P. C. Watson, W. Y. S. Chan, A. Kearns, e H. A. Ring. 2013. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity in adults with intellectual disabilities: a preliminary investigation. *Journal of intellectual disability research : JIDR* 57:539–551.
- Rabbani, B., M. Tekin, e N. Mahdieh. 2014. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of Human Genetics* 59:5–15.
- Rauch, A., D. Wieczorek, E. Graf, T. Wieland, S. Endeke, T. Schwarzmayr, B. Albrecht, D. Bartholdi, J. Beygo, N. Di Donato, A. Dufke, K. Cremer, M. Hempel, D. Horn, J. Hoyer, P. Joset, A. Röpke, U. Moog, A. Riess, C. T. Thiel, A. Tzschach, A. Wiesener, E. Wohlleber, C. Zweier, A. B. Ekici, A. M. Zink, A. Rump, C. Meisinger, H. Grallert, H. Sticht, A. Schenck, H. Engels, G. Rappold, E. Schröck, P. Wieacker, O. Riess, T. Meitinger, A. Reis, e T. M. Strom. 2012. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet (London, England)* 380:1674–1682.
- Raul, J.-S., V. Cirimele, B. Ludes, e P. Kintz. 2004. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clinical Biochemistry* 37:1105–1111.
- Reuter, M. S., H. Tawamie, R. Buchert, O. Hosny Gebril, T. Froukh, C. Thiel, S. Uebe, A. B. Ekici, M. Krumbiegel, C. Zweier, J. Hoyer, K. Eberlein, J. Bauer, U. Scheller, T. M. Strom, S. Hoffjan, E. R. Abdelraouf, N. A. Meguid, A. Abboud, M. A. Al Khateeb, M. Fakher, S. Hamdan, A. Ismael, S. Muhammad, E. Abdallah, H. Sticht, D. Wieczorek, A. Reis, e R. Abou

- Jamra. 2017. Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA psychiatry* 74:293–299.
- Rohleder, N., U. M. Nater, J. M. Wolf, U. Ehlert, e C. Kirschbaum. 2004. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: an indicator of sympathetic activity? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032:258–263.
- Rump, P., O. Jazayeri, K. K. van Dijk-Bos, L. F. Johansson, A. J. van Essen, J. B. G. M. Verheij, H. E. Veenstra-Knol, E. J. W. Redeker, M. M. A. M. Mannens, M. A. Swertz, B. Z. Alizadeh, C. M. A. van Ravenswaaij-Arts, R. J. Sinke, e B. Sikkema-Raddatz. 2016. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. *BMC Medical Genomics* 9.
- Salvador-Carulla, L., G. M. Reed, L. M. Vaez-Azizi, S.-A. Cooper, R. Martinez-Leal, M. Bertelli, C. Adnams, S. Cooray, S. Deb, L. Akoury-Dirani, S. C. Girimaji, G. Katz, H. Kwok, R. Luckasson, R. Simeonsson, C. Walsh, K. Munir, e S. Saxena. 2011. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for “mental retardation/intellectual disability” in ICD-11. *World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)* 10:175–180.
- Sampson, J., K. Jacobs, M. Yeager, S. Chanock, e N. Chatterjee. 2011. Efficient study design for next generation sequencing. *Genetic Epidemiology* 35:269–277.
- Sanger, F., S. Nicklen, e A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463–5467.
- Santos, I., A. J D Barros, A. Matijasevich, R. Zanini, M. Cesar, F. Camargo-Figuera, I. Oliveira, F. Colugnati, e C. Victora. 2014. Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International journal of epidemiology* 43.
- dos Santos, M. J. P., D. G. Bernabé, A. C. de M. S. Nakamune, S. H. V. Perri, S. M. H. C. Á. de Aguiar, e S. H. P. de Oliveira. 2012. Salivary alpha amylase and cortisol levels in children with global developmental delay and their relation with the expectation of dental care and behavior during the intervention. *Research in developmental disabilities* 33:499–505.
- Saridjan, N. S., J. Henrichs, J. J. Schenk, V. W. V. Jaddoe, A. Hofman, C. Kirschbaum, F. C. Verhulst, e H. Tiemeier. 2014. Diurnal cortisol rhythm and cognitive functioning in toddlers: the Generation R Study. *Child neuropsychology: a journal on normal and abnormal development in childhood and adolescence* 20:210–229.
- Schofield, D. J., R. N. Shrestha, R. Percival, S. J. Kelly, M. E. Passey, e E. J. Callander. 2011. Quantifying the effect of early retirement on the wealth of individuals with depression or other mental illness. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 198:123–128.
- Schouten, J. P., C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, F. Diepvens, e G. Pals. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 30:e57.

- Schwartzman, J. S., e V. R. G. Lederman. 2017. Deficiência intelectual: causas e importância do diagnóstico e intervenção precoces. *Inclusão Social* 10.
- Shang, L., M. T. Cho, K. Retterer, L. Folk, J. Humberson, L. Rohena, A. Sidhu, S. Saliganan, A. Iglesias, P. Vitazka, J. Juusola, A. H. O'Donnell-Luria, Y. Shen, e W. K. Chung. 2015. Mutations in ARID2 are associated with intellectual disabilities. *Neurogenetics* 16:307–314.
- Shendure, J., e H. Ji. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1135–1145.
- Shonkoff, J. P., W. T. Boyce, e B. S. McEwen. 2009. Neuroscience, Molecular Biology, and the Childhood Roots of Health Disparities: Building a New Framework for Health Promotion and Disease Prevention. *JAMA* 301:2252–2259.
- Shonkoff, J. P., L. Richter, J. van der Gaag, e Z. A. Bhutta. 2012. An integrated scientific framework for child survival and early childhood development. *Pediatrics* 129:e460-472.
- Silva, A. C. P. 2017. Moduladores genéticos do ritmo circadiano em humanos: associação de polimorfismos em genes da via aferente do Núcleo Supraquiasmático (NSQ) com preferência diurna e hábitos de sono.
- Silva, A. M. B. da, e S. R. F. Enumo. 2014. Estresse em um fio de cabelo: revisão sistemática sobre cortisol capilar. *Avaliação Psicológica* 13:203–211.
- Snoeiijen-Schouwenaars, F. M., J. S. van Ool, J. S. Verhoeven, P. van Mierlo, H. M. H. Braakman, E. E. Smeets, J. Nicolai, J. Schoots, M. W. A. Teunissen, R. P. W. Rouhl, I. Y. Tan, H. G. Yntema, H. G. Brunner, R. Pfundt, A. P. Stegmann, E.-J. Kamsteeg, H. J. Schelhaas, e M. H. Willemsen. 2018. Diagnostic exome sequencing in 100 consecutive patients with both epilepsy and intellectual disability. *Epilepsia* 60:155–164.
- Srivastava, A. K., e C. E. Schwartz. 2014. Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders: Causal Genes and Molecular Mechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 46 Pt 2:161–174.
- Sun, Y., C. A. L. Ruivenkamp, M. J. V. Hoffer, T. Vrijenhoek, M. Kriek, C. J. van Asperen, J. T. den Dunnen, e G. W. E. Santen. 2015. Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? *Human Mutation* 36:648–655.
- Symons, F. J., J. J. Wolff, L. S. Stone, T. K. Y. Lim, e J. W. Bodfish. 2011. Salivary biomarkers of HPA axis and autonomic activity in adults with intellectual disability with and without stereotyped and self-injurious behavior disorders. *Journal of neurodevelopmental disorders* 3:144–151.
- Tan, T. Y., O. J. Dillon, Z. Stark, D. Schofield, K. Alam, R. Shrestha, B. Chong, D. Phelan, G. R. Brett, E. Creed, A. Jarmolowicz, P. Yap, M. Walsh, L. Downie, D. J. Amor, R. Savarirayan, G. McGillivray, A. Yeung, H. Peters, S. J. Robertson, A. J. Robinson, I. Macciocca, S. Sadedin, K. Bell, A. Oshlack, P. Georgeson, N. Thorne, C. Gaff, e S. M. White. 2017. Diagnostic Impact and Cost-effectiveness of Whole-Exome Sequencing for Ambulant Children With Suspected Monogenic Conditions. *JAMA pediatrics* 171:855–862.
- Tassé, M. J., R. Luckasson, e M. Nygren. 2013. AAIDD proposed recommendations for ICD-11 and the condition previously known as mental retardation. *Intellectual and Developmental Disabilities* 51:127–131.

- Teer, J. K., e J. C. Mullikin. 2010. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Human Molecular Genetics* 19:R145-151.
- Thevenon, J., Y. Duffourd, A. Masurel-Paulet, M. Lefebvre, F. Feillet, S. El Chehadeh-Djebbar, J. St-Onge, A. Steinmetz, F. Huet, M. Chouchane, V. Darmency-Stamboul, P. Callier, C. Thauvin-Robinet, L. Faivre, e J. B. Rivière. 2016. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clinical Genetics* 89:700–707.
- Topper, S., C. Ober, e S. Das. 2011. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clinical Genetics* 80:117–126.
- United Nations Children's Fund. 2011. The State of the World's Children 2011: Adolescence – An Age of Opportunity. https://www.unicef.org/publications/index_57468.html.
- Veltman, J. A., e H. G. Brunner. 2012. De novo mutations in human genetic disease. *Nature reviews. Genetics* 13:565–575.
- Victora, C. G., L. Adair, C. Fall, P. C. Hallal, R. Martorell, L. Richter, H. S. Sachdev, e Maternal and Child Undernutrition Study Group. 2008. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet (London, England)* 371:340–357.
- Vissers, L. E. L. M., C. Gilissen, e J. A. Veltman. 2016. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews. Genetics* 17:9–18.
- Vissers, L. E. L. M., J. de Ligt, C. Gilissen, I. Janssen, M. Steehouwer, P. de Vries, B. van Lier, P. Arts, N. Wieskamp, M. del Rosario, B. W. M. van Bon, A. Hoischen, B. B. A. de Vries, H. G. Brunner, e J. A. Veltman. 2010. A de novo paradigm for mental retardation. *Nature Genetics* 42:1109–1112.
- Wadhwa, P. D., L. Glynn, C. J. Hobel, T. J. Garite, M. Porto, A. Chicz-DeMet, A. K. Wiglesworth, e C. A. Sandman. 2002. Behavioral perinatology: biobehavioral processes in human fetal development. *Regulatory Peptides* 108:149–157.
- Wechsler, D. 1983. Teste de inteligência para pré-escolares (WPPSI). Translated and Adapted by Permission. Copyright 1963, 1967 by the Psychological Corporation. New York, N.Y. USA. All rights reserved / Traducido y adaptado con permiso. Copyright 1983 de esta edición en Castellano by Editorial Paidós, Defensa 59-1er. piso, Buenos Aires.
- Wechsler, D. 1992. Wechsler Intelligence Scale for Children. San Antonio TX, Psychological Corp., Harcourt Brace 1992. Third edition.
- Wechsler, D. 2003. Escala de Inteligência de Wechsler para a Idade Pré-escolar e Primária – Edição revista. Lisboa, Portugal: CEGOC. (Original work published 1989).
- Weitzman, E. D., D. Fukushima, C. Nogueira, H. Roffwarg, T. F. Gallagher, e L. Hellman. 1971. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 33:14–22.
- Wennig, R. 2000. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International* 107:5–12.
- Whirledge, S., e J. A. Cidlowski. 2013a. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 154:4450–4468.

- Whirledge, S., e J. A. Cidlowski. 2013b. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 154:4450–4468.
- WHO, W. H. O. 1998. Primary prevention of mental, neurological and psychosocial disorders. World Health Organization.
- Wilfert, A. B., A. Sulovari, T. N. Turner, B. P. Coe, e E. E. Eichler. 2017. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome medicine* 9:101.
- Willemsen, M. H., e T. Kleefstra. 2014. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clinical genetics* 85:101–110.
- Winnepenninckx, B., L. Rooms, e R. F. Kooy. 2003. Mental Retardation: A Review of the Genetic Causes. *The British Journal of Development Disabilities* 49:29–44.
- Wosu, A. C., U. Valdimarsdóttir, A. E. Shields, D. R. Williams, e M. A. Williams. 2013. Correlates of cortisol in human hair: implications for epidemiologic studies on health effects of chronic stress. *Annals of Epidemiology* 23:797-811.e2.

II. ALTERAÇÕES NO PROJETO DE PESQUISA

ALTERAÇÕES NO PROJETO DE PESQUISA

Ao longo da execução da tese algumas modificações dos artigos planejados foram necessárias. A seguir, serão expostas as alterações realizadas e suas fundamentações.

Artigo 1: “Sequenciamento do exoma completo na caracterização e investigação da etiologia da deficiência intelectual: uma revisão sistemática. ”

Os termos da chave de busca nas bases bibliográficas do primeiro artigo (artigo de revisão) proposto no projeto foram alterados, o que resultou em maior especificidade e sendo mais coeso com os critérios de inclusão e exclusão dos artigos buscados. A chave utilizada foi: ("intellectual disability" OR "mental retardation" OR "mental deficiency" OR "developmental disorders" OR "neurogenetic disorders" OR "monogenic disorder") AND (whole exome sequencing OR "high-throughput DNA sequencing" OR "massively parallel sequencing" OR "exomes" OR "exome sequencing" OR "whole-exome sequencing") AND ("genetics") NOT ("syndrome" OR "case reports" OR "case report"). Adicionalmente, foi possível realizar meta-análise com os dados das taxas de diagnóstico para DI via WES dos artigos incluídos, o que não havia sido previamente planejado. Neste sentido, o artigo intitulado “The contribution of whole-exome sequencing to intellectual disability diagnosis and knowledge of underlying molecular mechanisms: A systematic review and meta-analysis.” substitui o artigo proposto.

Artigo 2: “Estudo de sequenciamento de exoma para identificação de variantes/mutações de novo causais/marcadores de deficiência intelectual em casos idiopáticos da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004”

O segundo artigo (artigo original 1) proposto no projeto foi substituído pelo artigo: “Evaluation of genomic factors and early childhood stimulation on intelligence in children from a Brazilian birth cohort: the primary role of independent factors”. Essa modificação foi necessária já que os dados do sequenciamento de exoma, necessários para realizar o artigo proposto no projeto, não evidenciaram mutações patogênicas ou provavelmente patogênica nos 13 indivíduos avaliados. Apenas um indivíduo teve uma mutação de significado clínico incerto (VUS-do inglês Variant of uncertain significance). Esses dados foram publicados como resumo no congresso “2021 World Congress of Psychiatric Genetics” (doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.08.050) (Anexo A). Foi consenso que esses dados teriam maior adequação como publicação em periódico com perfil clínico do que como epidemiológico e de saúde pública. Com este novo enfoque, o artigo não se adequa dentro de uma tese proveniente de um Programa de Pós-graduação em Epidemiologia. Assim, o novo artigo, que substitui o inicialmente proposto, avalia a associação de fatores genéticos e escore de estimulação durante a infância com inteligência (QI) aos 6 anos, e possível interação entre esses fatores.

Artigo 3: “Níveis de cortisol capilar e sua associação com deficiência intelectual em adolescentes de 15 anos de idade da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004”

Por fim, o artigo 3, agora intitulado: “Association between intellectual disability and hair cortisol concentration in adolescents from a Brazilian population-based birth cohort.”, manteve seu objetivo original de comparar as concentrações de cortisol capilar entre indivíduos com e sem DI, na coorte de nascimentos de Pelotas de 2004. Adicionalmente decidiu-se verificar se a etiologia da DI modifica a associação com os níveis de cortisol na adolescência. O modelo de análise final foi modificado em relação ao DAG apresentado no projeto. Foram incluídas apenas variáveis associadas à técnica de dosagem de cortisol capilar e variáveis socioeconômicas.

Título da Tese: “Aspectos genéticos e fisiológicos envolvidos na deficiência intelectual: identificação de mutações de novo por sequenciamento de exoma completo e avaliação de estresse crônico por cortisol capilar. ”

Como consequência destas modificações, o título da tese sofreu alteração para o seguinte: “Aspectos genéticos e fisiológicos envolvendo estresse crônico relacionados a deficiência intelectual e habilidades cognitivas de crianças e adolescentes da coorte de nascimentos de Pelotas de 2004”, englobando os itens alterados.

III. RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO



Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Medicina
Departamento de Medicina Social
Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia



**COORTE DE NASCIMENTOS DE 2004 DE PELOTAS-RS:
ACOMPANHAMENTO DOS 15-16 ANOS**

Relatório Geral de Trabalho de Campo
Relatório Financeiro de Trabalho de Campo



Pelotas, RS
2021

Autora:

Isabel Oliveira Bierhals

Colaboradores:

Luciana Tovo Rodrigues

Deise Cristina Modesto

Karen Sánchez

Pedro Augusto Crespo da Silva

Riceli Rodeghiero

SUMÁRIO

I. RELATÓRIO GERAL DE TRABALHO DE CAMPO	4
1.HISTÓRIA BREVE DA COORTE DE NASCIMENTOS DE 2004	126
2.ACOMPANHAMENTO DOS 15-16 ANOS (2019/2020).....	127
3.ATIVIDADES ANTERIORES AO TRABALHO DE CAMPO	127
3.1 Recrutamento de pessoal (auxiliares de pesquisa).....	129
3.2 Localização dos participantes	130
3.3 Recrutamento de pessoal (entrevistadores e psicólogos).....	132
3.4 Treinamentos específicos.....	133
3.5 Estudo piloto	134
4..... INSTRUMENTOS DE PESQUISA	135
4.1 REDCap	135
4.2 Questionários	135
4.2.1 Questionários aplicados à mãe ou responsável	135
4.2.2 Testes psicológicos aplicados à mãe ou responsável	138
4.2.3 Questionários aplicados ao(à) adolescente.....	139
4.3 Equipamentos.....	143
4.3.1 Antropometria, pressão arterial e coleta de cabelo	143
4.3.2 BodPod	145
4.3.3 DXA	145
4.3.4 Acelerômetro	145
5..... MANUAIS DE INSTRUÇÃO	145
6..... TRABALH O DE CAMPO	146
6.1 Início do trabalho de campo.....	146

6.2 Logística do trabalho de campo	146
6.2.1 Recepção dos(as) adolescentes.....	146
6.2.2 Entrevistas	148
6.2.3 Psicólogos(as).....	148
6.2.4 CANTAB	148
6.2.5 Equipamentos	149
6.2.6 Acelerometria	149
6.2.7 Encerramento da visita.....	156
6.2.8 Estratégias de busca dos(as) adolescentes.....	159
7.SUBESTUDO	DEFICIÊNCIA
INTELECTUAL	160
8.SITUAÇÕES	ADVERSAS
NA CONDUTA	E
	ALTERAÇÕES
	161
9.CONTROLE	DO
TRABALHO DE CAMPO	ANDAMENTO
	DO
	162
10.CONTROLE	DE
DOS DADOS	QUALIDADE
	162
11.....	REVERSÃO
DE RECUSAS.....	163
12.HISTÓRICO	DE
NO MUNDO	COVID-19
	NO
	BRASIL
	E
	163
13.COORTE	2004
CORONAVÍRUS	E
	A
	PANDEMIA
	DO
	NOVO
	168
14.....	OUT
RAS CIDADES	169
15.....	GERENCIAMENTO
DOS DADOS	170
11.1 REDCap.....	170
11.2 Equipamentos.....	170
11.3 Análise de inconsistências	171

16.		
.....		
EQUIPE.....		171
14.1 Reuniões de trabalho.....		172
14.1.1 Pesquisadores, supervisão e colaboradores.....		172
14.1.2 Equipe.....		173
14.2 Alterações na equipe no decorrer do trabalho de campo.....		173
17.....	ASPECTOS	
FINANCEIROS.....		173
18.....	QUES	
TÕES ÉTICAS.....		174
19.RESULTADOS	PRELIMINARES	DO
TRABALHO DE CAMPO.....		174
II. RELATÓRIO FINANCEIRO DE TRABALHO DE CAMPO.....		1266
REFERÊNCIAS.....		179
ANEXOS.....		62

***I. RELATÓRIO GERAL DE TRABALHO
DE CAMPO***

1. HISTÓRIA BREVE DA COORTE DE NASCIMENTOS DE 2004

A “Coorte de Nascimentos de 2004” é um estudo longitudinal coordenado pelos pesquisadores Dra. Iná Santos, Dra. Alicia Matijasevich, Dr. Aluísio Barros e Dra. Luciana Tovo Rodrigues. No ano de 2004, todos os nascidos vivos na cidade de Pelotas, cujas famílias residiam no local, foram elegíveis para participar do estudo, que objetivou avaliar aspectos da saúde dos participantes. Das 4.263 crianças identificadas, os pais de 4.231 aceitaram participar do estudo, caracterizando o estudo perinatal e o tamanho de amostra dessa coorte.

Foram realizados sete acompanhamentos desde 2004, aos 3, 12, 24, 48 meses e 6-7, 10 anos e 15-16 anos. Este relatório descreve o acompanhamento de 15-16 anos da coorte. No estudo perinatal, as mães foram entrevistadas quanto às características socioeconômicas, demográficas e reprodutivas e à utilização de serviços de saúde, práticas de amamentação, estilos de vida e morbidade. As entrevistas e exames de recém-nascidos foram realizados nas maternidades. Nos acompanhamentos aos 3, 12, 24 e 48 meses de idade, a mãe ou cuidadora foi entrevistada e a criança examinada em casa. Foram coletadas informações sobre características socioeconômicas e demográficas, utilização de serviços de saúde, práticas alimentares, estilos de vida e crescimento infantil, desenvolvimento e morbidade desde o nascimento. Em 2010/2011, foi realizado o acompanhamento dos 6-7 anos de idade já na clínica do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) Dr. Amílcar Gigante da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram coletadas informações detalhadas de saúde, dieta e estilo de vida das famílias, condições de moradia, comportamentos de saúde, assistência médica e qualidade de vida das crianças e mães. Também foram realizadas medidas antropométricas, avaliação da composição corporal e atividade física, espirometria e pressão arterial, além da aplicação de testes para avaliação da cognição e saúde mental a todas as crianças. Em 2015, no acompanhamento dos 10 anos de idade, as crianças e suas mães foram novamente avaliadas na clínica do CPE. Foram aplicados dois questionários: um direcionado à mãe, contendo informações detalhadas sobre cuidados e saúde da criança, características da mãe, família e domicílio, além de saúde materna e qualidade de vida; e outro aplicado a criança, contendo questões sobre escola, atividade física, sono, alimentação, eventos estressores, percepção corporal, escala de faces, computador/internet, locus de controle, saúde bucal, menstruação (apenas para as meninas) e um questionário confidencial. Também foram realizadas medidas antropométricas, avaliação da composição corporal,

pressão arterial e espirometria, além de testes para avaliação da cognição e saúde mental das crianças e de suas mães e/ou responsáveis. Detalhes metodológicos referentes aos acompanhamentos prévios da Coorte de 2004 já se encontram publicados (Santos et al., 2011; Santos et al., 2014).

2. ACOMPANHAMENTO DOS 15-16 ANOS (2019/2020)

O acompanhamento dos 15-16 anos foi realizado de maneira presencial entre 20/11/2019 e 17/03/2020, no CPE Dr. Amilcar Gigante da UFPel, e de 31/03/2020 a 22/10/2020, em vigência da pandemia por COVID-19, via telefone. Ao todo, foram entrevistados 2.029 adolescentes, correspondendo a uma taxa de acompanhamento de 50,4%. A Tabela 1 apresenta o número de participantes incluídos em cada acompanhamento. A taxa de acompanhamento em cada visita foi calculada dividindo-se o total obtido pela soma entre o número de entrevistas realizadas e o número de óbitos acumulados no período pelo número de nascidos vivos.

3. ATIVIDADES ANTERIORES AO TRABALHO DE CAMPO

O planejamento do acompanhamento dos 15-16 anos teve início em maio de 2019, a partir da seleção e elaboração de instrumentos a serem utilizados e organização da logística a ser seguida. A equipe de pesquisa do acompanhamento foi composta pela coordenadora do trabalho de campo, Professora Luciana Tovo Rodrigues, pela pós-doutoranda e supervisora do trabalho de campo, Isabel Oliveira Bierhals, doutorandos Karen Sánchez, Pedro Augusto Crespo da Silva e Riceli Rodeghiero, pós-doutoranda Bianca Del Ponte da Silva e coordenadores do estudo, Professores Iná Santos, Alicia Matijasevich e Aluísio Barros. Uma série de reuniões mensais de equipe sucederam-se até que o trabalho pudesse ser iniciado. Nestas reuniões foram definidos a logística, os instrumentos e os exames a serem aplicados.

O presente relatório de trabalho de campo descreve, a seguir, todas as atividades desenvolvidas no acompanhamento dos membros da Coorte de 2004, em 2019/2020.

Tabela 1. Descrição dos números referentes a cada acompanhamento realizado na Coorte de Nascimentos de 2004. Pelotas-RS.

Acompanhamento	Perinatal	3 meses	12 meses	24 meses	48 meses	6 anos	10-11 anos	15-16 anos
Entrevistas realizadas	4.231	3.985	3.907	3.869	3.799	3.722	3.566	1.949
Óbitos*	-	66	82	88	94	95	98	102
Recusas (%)	32 (0,8)	26 (0,6)	26 (0,6)	40 (0,9)	51 (1,2)	27 (0,6)	68 (1,6)	76 (1,8)
Perdas (%)	-	154 (3,6)	216 (5,1)	234 (5,5)	287 (6,8)	387 (9,2)	499 (11,8)	2.104 (49,7) [‡]
Perdas + Recusas (%)	32 (0,8)	180 (4,3)	242 (5,7)	274 (6,5)	338 (8,0)	414 (9,8)	567 (13,4)	2.180 (51,5)
Taxa de Acompanhamento (%)	99,2	95,7	94,3	93,5	92,0	90,2	86,6	48,5

*Número cumulativo.

[‡]Acompanhamento interrompido devido à pandemia de COVID-19.

3.1 Recrutamento de pessoal (auxiliares de pesquisa)

Nos dias 04, 05 e 08 de julho de 2019, ocorreu a seleção da equipe de auxiliares de pesquisa da Coorte 2004. O processo de seleção deu-se por meio de um edital público, denominado *Processo seletivo simplificado para os cursos de aperfeiçoamento: “Capacitação em planejamento e execução de primeiras etapas de inquéritos epidemiológicos I e II”*, divulgado de maneira *on-line*, no dia 10 de junho de 2019, no site da UFPEL, site do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGEpi), no perfil do *Facebook* “Coortes Pelotas” e também enviado para divulgação, via *e-mail*, para a rede de contatos da secretaria do PPGEpi.

Um grupo de 71 pessoas candidatou-se para as quatro vagas (uma para secretariado e três para telefonista). Na primeira etapa de seleção, os critérios avaliados para pontuação foram pós-graduação *lato* ou *stricto sensu* em qualquer área (1 ponto), participação em trabalhos de campo em pesquisas epidemiológicas (1 ponto por projeto – máximo de 4 pontos), experiência profissional em atividades administrativas de pesquisa epidemiológica (1 ponto por projeto – máximo de 4 pontos) e bolsa de iniciação científica na graduação (1 ponto), totalizando uma pontuação máxima de 10 pontos. Um total de 49 participantes enviaram a documentação completa exigida (requerimento de inscrição, declaração de ensino médio em escola pública brasileira, declaração de etnia, declaração de disponibilidade de 40 horas semanais, declaração de vínculo empregatício e documentos comprobatórios dos critérios de avaliação). Destes, 12 foram selecionados para participar do treinamento, que visou apresentar o trabalho a ser realizado, introdução às ferramentas REDCap (Harris et al., 2009) e *Excel*, além da atividade prática de agendamentos. O treinamento foi coordenado pelas Professoras Luciana Tovo Rodrigues e Renata Moraes Bielemann, pelas pós-doutorandas Isabel Oliveira Bierhals e Bianca Del Ponte da Silva e contou com a colaboração de Silvia Pinto, Neiva Vale, Carla Santos, Pedro Augusto Crespo da Silva, Francine Costa e Luídi Vidaletti.

A avaliação dos candidatos foi realizada a partir de uma prova teórica e um teste prático. A parte teórica constava de 18 questões (ANEXO 1) sobre temas abordados no treinamento. O teste prático simulava a realização do agendamento de uma visita de uma participante da coorte, com o objetivo de observar a desenvoltura do candidato em uma ligação telefônica. A partir destas avaliações, foram selecionados quatro participantes para integrarem a equipe e darem início ao trabalho, que envolveu atividades de secretaria e de localização dos participantes (via ligação telefônica e *Facebook*, para atualização de cadastro). A equipe iniciou as atividades no dia 05 de agosto de 2019.

3.2 Localização dos participantes

A localização dos participantes teve início em agosto de 2019 e estendeu-se durante todo o trabalho de campo. Diversas estratégias de busca foram adotadas simultaneamente, visando reduzir as perdas de acompanhamento. Quando localizados, os pais ou responsáveis eram informados sobre a realização de um novo acompanhamento da Coorte 2004 e uma futura visita ao CPE. Cada um dos métodos de busca utilizados será descritos na sequência temporal dos acontecimentos.

✓ *Atualização do banco de dados cadastrais dos 10 anos (2015)*

A partir de agosto de 2019, dois auxiliares de pesquisa ficaram responsáveis por realizar a atualização de dados cadastrais dos membros da Coorte 2004. Para tal, utilizou-se como base o banco de dados do último acompanhamento, sendo geradas três listas: (1) Total de participantes da coorte, retirados os casos de óbitos; (2) Total de participantes da coorte menos os casos de óbitos e participantes do subestudo de saúde bucal; (3) Total de participantes do subestudo de saúde bucal menos os casos de óbitos. A lista (1) foi utilizada como a população-alvo para o presente acompanhamento (adolescentes elegíveis) e as listas (2) e (3) determinaram a ordem das ligações para atualização de cadastro. Tendo em vista que o subestudo de saúde bucal foi realizado em 2017, esperava-se que os acompanhados no subestudo estariam com o cadastro mais atualizado do que aqueles que não participaram. Por isso, a lista (2) foi a primeira a ser selecionada, e, após a conclusão desta, seguiu-se para a lista (3).

Foram realizadas ligações do CPE para todos os contatos existentes no banco de dados do último acompanhamento. Em cada ligação, era realizada a atualização de endereços, contatos telefônicos e demais informações (ponto de referência da residência, nome e/ou endereço de trabalho do responsável e contato de algum familiar ou conhecido próximo). Também era informado sobre a brevidade do acompanhamento dos 15-16 anos e que ligação futura, com o objetivo de realizar o agendamento, seria realizada. Quando era localizado apenas o(a) adolescente, pedia-se o contato do seu responsável. Desta forma, sempre que possível, o contato era realizado com alguém maior de idade, tanto para atualização do cadastro, quanto para o agendamento da visita à clínica do CPE.

✓ *Busca dos(as) adolescentes em redes sociais*

A procura pelos adolescentes, mas principalmente pelos seus pais ou responsáveis em redes sociais, iniciou também em agosto de 2019, por meio da rede social *Facebook*,

utilizando a busca textual pelos nomes dos participantes e de seus pais ou responsáveis. Esta busca foi realizada por um dos auxiliares de pesquisa. Nesta mesma rede social, também houve interação com os participantes e divulgação de informações sobre o acompanhamento via perfil “Coortes Pelotas” e via página (*fanpage*) da Coorte de 2004. No decorrer do tempo, devido à ausência de resposta aos telefonemas e às mensagens no *Facebook*, iniciou-se a busca dos pais ou responsáveis por meio do aplicativo *WhatsApp*. De maneira semelhante ao contato telefônico, quando era encontrado apenas o(a) adolescente, logo pedia-se o contato do seu responsável, para que todas as informações fossem providas por alguém maior de idade.

Esta busca inicial manteve-se até o início do trabalho de campo, quando o referido auxiliar de pesquisa foi deslocado para outra atividade e o trabalho, até então realizado por ele, foi dividido entre os outros dois auxiliares de pesquisa, inicialmente responsáveis pela atualização cadastral e agendamento dos participantes e seus responsáveis.

✓ ***Rastreamento dos(as) adolescentes nos domicílios***

Em novembro de 2019 foi contratado o primeiro auxiliar de rastreamento para se deslocar até os endereços dos participantes, cujo contato telefônico não havia sido possível. Este era responsável por visitar os endereços fornecidos em visitas prévias (pessoais e de pessoas conhecidas) e atualizar o banco de dados. Por motivos logísticos, o primeiro teve que ausentar-se do trabalho e, em dezembro de 2019, contratou-se outro profissional para dar andamento ao trabalho.

Um auxiliar de pesquisa era o ponto focal do rastreador, sendo responsável por selecionar e imprimir, do banco de dados cadastral, informações de endereços e contatos secundários (de familiares, vizinhos ou pessoas próximas), indicados no último acompanhamento. Uma vez localizado o domicílio do(a) adolescente, eram atualizados os contatos e informado que, em breve, receberiam uma ligação convidando-os para participar do acompanhamento, e, quando possível, realizado o agendamento do(a) adolescente e de seu responsável para uma visita ao CPE.

Em fevereiro de 2020, contratou-se um segundo auxiliar de rastreamento para realizar, simultaneamente, a busca dos endereços dos participantes inicialmente não localizados.

3.3 Recrutamento de pessoal (entrevistadores e psicólogos)

Entre os dias 30 de setembro e 04 de outubro de 2019, ocorreu a seleção da equipe de entrevistadores e psicólogos da Coorte 2004. O processo de seleção deu-se por meio de um edital público denominado *Processo seletivo simplificado para os cursos de aperfeiçoamento: “Capacitação em planejamento e execução de primeiras etapas de inquéritos epidemiológicos I e II”*, divulgado de maneira *on-line*, no dia 02 de setembro de 2019, no *site* da UFPEL, *site* do PPGEpi, no perfil do *Facebook* “Coortes Pelotas” e também enviado para divulgação via *e-mail* para a rede de contatos da secretaria do PPGEpi.

Um grupo de 36 pessoas candidatou-se para as 10 vagas de psicólogo (denominado Categoria I) e 172 pessoas para as 29 vagas de entrevistador (denominado Categoria II). Na primeira etapa de seleção, os critérios avaliados para pontuação na Categoria I foram pós-graduação *lato* ou *stricto sensu* em qualquer área (1 ponto), participação em trabalhos de campo em pesquisas epidemiológicas e/ou experiência comprovada em coleta de dados em saúde mental (1 ponto por projeto – máximo de 7 pontos) e participação em projetos de pesquisa, ensino e extensão durante a graduação (1 ponto – máximo de 2 pontos). Já os critérios avaliados na Categoria II foram pós-graduação *lato* ou *stricto sensu* em qualquer área (1 ponto), participação em trabalhos de campo em pesquisas epidemiológicas (1 ponto por projeto – máximo de 7 pontos) e participação em projetos de pesquisa, ensino e extensão durante a graduação (1 ponto – máximo de 2 pontos).

Todos os candidatos a Categoria I e 160 candidatos a Categoria II enviaram documentação completa exigida (requerimento de inscrição, declaração de disponibilidade de 36 horas semanais e documentos comprobatórios dos critérios de avaliação). Destes, 20 candidatos a Categoria I e 60 candidatos a Categoria II foram selecionados para participar do treinamento geral (apresentação do trabalho a ser realizado) e treinamento específico para aplicação do questionário do(a) adolescente e do(a) responsável. O treinamento foi coordenado pelas Professoras Luciana Tovo Rodrigues e Renata Moraes Bielemann, pelas pós-doutorandas Isabel Oliveira Bierhals e Bianca Del Ponte da Silva e contou com a colaboração dos doutorandos Francine Santos e Pedro Augusto Crespo da Silva, além de Silvia Pinto, Carla Santos, Bruna Schneider e Gabriela Callo.

Nos últimos dois dias de treinamento, os psicólogos (Categoria I) participaram de um treinamento específico sobre um dos instrumentos de saúde mental, *Development and*

Well-Being Assessment (DAWBA). Este treinamento foi coordenado pelo Professor Tiago Neuenfeld Munhoz, com colaboração da pós-doutoranda Gabriela Callo.

Todos os participantes receberam os questionários e manual de instruções em papel, além de versões em PDF terem sido enviadas via *e-mail*. Todos puderam aplicar e tirar dúvidas sobre o conteúdo dos mesmos.

A avaliação dos candidatos foi realizada a partir de uma prova teórica, contendo 20 questões sobre temas abordados no treinamento (com três questões diferenciando os candidatos das categorias I e II - ANEXOS 2 e 3), e uma avaliação prática, que ocorreu ao longo de uma semana, utilizando como critérios: desenvoltura, participação, interesse e presença. A partir destas avaliações, foi selecionada a equipe de trabalho de campo e designada a função de cada um, assim como o turno de trabalho, conforme as vagas disponíveis: entrevistadoras (10), psicólogos (10), recepcionistas (4), organizadores do fluxo de entrevistas e exames (4), supervisores do questionário de frequência alimentar (QFA) (2), antropometristas (4), operadores do BodPod (2), operadores do DXA (2) e responsável pela acelerometria (1). A partir desta subdivisão, ocorreram os treinamentos específicos. A equipe iniciou o trabalho de campo no dia 18 de novembro de 2019, no dia do estudo piloto.

3.4 Treinamentos específicos

Após designada a função de cada membro da equipe, deu-se início aos treinamentos específicos, que ocorreram do dia 29 de outubro a 14 de novembro de 2019. Estes foram divididos da seguinte forma:

- ✓ **Antropometria:** Ocorreu de 29 de outubro a 1º de novembro e foi coordenado pela pós-doutoranda Bruna Schneider e pela Professora Renata Moraes Bielemann, com colaboração da doutoranda Riceli Rodeghiero. Participaram as quatro antropometristas e as duas supervisoras do QFA, as quais foram padronizadas para as medidas de circunferência de cintura e quadril, altura em pé, altura sentada e pressão arterial. As bolsistas selecionadas para coordenar o fluxo dos exames e aquelas responsáveis pelos equipamentos de BodPod e DXA foram padronizadas para realização da medida da altura em pé.
- ✓ **DXA:** O treinamento ocorreu no dia 04 de novembro, nos turnos de manhã e tarde, tendo sido coordenado pela Professora Renata Moraes Bielemann e pela doutoranda Riceli Rodeghiero. Participaram as duas operadoras do DXA, além das duas operadoras do BodPod.

- ✓ **BodPod:** O treinamento ocorreu no dia 05 de novembro, no turno da tarde, tendo sido coordenado pela Professora Silvana Paiva Orlandi, com colaboração da Professora Renata Moraes Bielemann e pela doutoranda Riceli Rodeghiero. Participaram as duas operadoras do BodPod, além das duas operadoras do DXA.
- ✓ **QFA:** O treinamento ocorreu nos dias 04 e 05 de novembro, no turno da tarde, e foi coordenado pela pós-doutoranda Gabriela Callo, com colaboração da doutoranda Francine Santos. Participaram as duas supervisoras do QFA e duas entrevistadoras nutricionistas (Fabiane Vidal e Francine Maagh).
- ✓ **Entrevistas:** O treinamento ocorreu nos dias 30 de outubro, no período da tarde, e 31 de outubro e 1º de novembro, nos turnos da manhã e tarde, tendo sido coordenado pela pós-doutoranda Isabel Oliveira Bierhals, com colaboração dos doutorandos Francine Santos, Pedro Augusto Crespo da Silva e Riceli Rodeghiero. Participaram as dez entrevistadoras e as quatro recepcionistas.
- ✓ **Recepção, Fluxo e Acelerometria:** O treinamento ocorreu no dia 05 de novembro, no turno da manhã, e foi coordenado por Deise Modesto, Pedro Augusto Crespo da Silva e pelo Professor Inácio Crochemore Mohnsam da Silva. Participaram as quatro recepcionistas, quatro responsáveis pelo fluxo e pelo responsável pela acelerometria.
- ✓ **Coleta de cabelo:** O treinamento ocorreu no dia 13 de novembro, no turno da manhã, coordenado pela Professora Luciana Tovo Rodrigues e pela doutoranda Káren Sanches, com colaboração de Clarice Brinck Brum. Participaram as quatro antropometristas e duas entrevistadoras (Fernanda Bastos e Caroline Pinto).
- ✓ **Psicólogos:** O treinamento ocorreu entre os dias 11 e 14 de novembro e foi coordenado pelos Professores Tiago Neuenfeld Munhoz e Adriana Argeu, com colaboração de Jéssica Mayumi Maruyama. Participaram os dez psicólogos selecionados.

3.5 Estudo piloto

O estudo piloto foi realizado no dia 18 de novembro de 2019. O trabalho foi supervisionado pelos doutorandos, coordenadora e supervisora do trabalho de campo, que observaram o funcionamento da logística proposta para o acompanhamento 15-16 anos da Coorte de 2004.

A equipe foi dividida conforme o turno de trabalho e realizou-se uma simulação de acompanhamento, com cinco adolescentes e mães voluntários. A simulação abrangeu todas as estações da clínica, incluindo recepção, entrevistas e exames. Essa estratégia

permitiu avaliar a logística inicialmente proposta, desde a chegada do(a) adolescente a clínica, até a sua saída, com entrega do brinde, dos resultados dos exames e colocação do acelerômetro, além de estimar o tempo de permanência em cada uma das estações.

4. INSTRUMENTOS DE PESQUISA

4.1 REDCap

O REDCap (*Research Electronic Data Capture*) foi desenvolvido e implantado inicialmente na Universidade *Vanderbilt*, EUA, e atualmente tem apoio de um amplo consórcio de parceiros internacionais.

O projeto REDCap foi desenvolvido para oferecer uma ferramenta intuitiva e reutilizável para a comunidade científica, para ser utilizada na coleta, armazenamento e difusão de dados de pesquisa. O REDCap possui uma interface acessível, que permite ao usuário inserir dados de estudos de forma segura e acurada (Harris et al., 2009).

4.2 Questionários

As questões elaboradas para a pesquisa foram agrupadas em blocos e então, aplicadas à mãe ou responsável (questionário da mãe) e ao adolescente (questionário do(a) adolescente). Ambos também respondiam um questionário confidencial auto aplicado. A mãe ou responsável respondia questões relacionadas à saúde mental, que incluíam os instrumentos *Development and Well-Being Assessment for Children and Adolescents* (DAWBA), *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI) e a Escala *Wechsler* Abreviada de Inteligência (WASI). O(A) adolescente respondia ainda um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) auto aplicado e um teste neuropsicológico, denominado *Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery* (CANTAB).

Com exceção do CANTAB, que era aplicado com auxílio de um *tablet*, todos os demais instrumentos eram aplicados utilizando computadores (*desktop*), sendo acessados através de *browser*, contendo o questionário na plataforma REDCap. Prevendo possíveis problemas técnicos com a rede de internet ou com os computadores, uma versão impressa de todos os questionários foi preparada. Além disso, se o(a) adolescente ou responsável apresentasse dificuldades para utilizar o aparelho, poderia utilizar a versão impressa.

4.2.1 Questionários aplicados à mãe ou responsável

4.2.1.1 Questionário geral da mãe

Foi aplicado ao responsável, preferencialmente à mãe do(a) adolescente (ANEXO 4 e 5). O questionário era composto pelos seguintes blocos:

BLOCO A (*identificação*): continha cinco questões, incluindo nome e número de identificação do(a) adolescente), nome da entrevistadora, data e horário do início da entrevista, grau de parentesco do responsável com o adolescente, se o responsável residia com o(a) adolescente, se o(a) adolescente tem irmão(ã) gêmeo(a) e, em caso afirmativo, se este residia com ele(a).

BLOCO B (*cuidado do adolescente*): composto por 18 questões, que abordavam informações como número de moradores no domicílio e sua respectiva identificação; se o adolescente tem pai, mãe e/ou irmãos falecidos; grau de contato do(a) adolescente com os pais biológicos e sociais; e como o(a) adolescente está se saindo na escola.

BLOCO C (*saúde do adolescente*): composto por 53 questões contendo perguntas relacionadas ao sono do(a) adolescente, saúde geral, enfermidades, audição e visão, morbidades (pneumonia e infecção urinária), consultas médicas, hospitalizações e medicações utilizadas.

BLOCO D (*características da mãe, da família e do domicílio*): composto por 30 questões tratando de temas como trabalho e escolaridade maternos, presença de companheiro, fumo, bolsa família e renda familiar.

BLOCO E (*bens de consumo*): composto por 13 questões abordando perguntas sobre posse de bens domiciliares.

BLOCO F (*eventos estressores*): composto por sete questões abordando temas relacionados a eventos estressores dentro do domicílio e de condições do bairro.

BLOCO G (*saúde da mãe*): composto por nove questões que tratavam sobre gestações e saúde reprodutiva da mãe.

BLOCO H (*Parent-Child Conflict Tactics Scales - CTSPC*): composto por 18 questões, este instrumento avalia a violência contra o(a) adolescente por meio de perguntas que descrevem variadas formas de disciplina. Ao longo do questionário, as medidas “mais adequadas” são propositadamente intercaladas com as “mais inadequadas” e as “violentas”. O instrumento original é composto por 22 questões, no entanto, para este acompanhamento, quatro questões foram excluídas, por tratarem de violência grave, o que teria implicações éticas para o estudo, uma vez que sua identificação requereria notificação dos responsáveis às autoridades legais.

BLOCO I (*Edinburgh Postnatal Depression Scale - EDINBURGH*): composto por dez questões, com quatro opções de resposta. Este instrumento é utilizado para avaliar a frequência (“ausente” até “diária”) de sintomas depressivos em mulheres no período pós-parto, referentes aos sete dias anteriores à entrevista.

Nos casos em que o(a) adolescente tinha irmão(ã) gêmeo(a), aplicava-se um questionário reduzido, contendo informações referentes ao segundo filho, sem que fosse necessário refazer as questões relacionadas à mãe/responsável e ao domicílio. Eram aplicados os **BLOCOS A** (identificação), **B** (*cuidado do adolescente*), **C** (*saúde do adolescente*), **F** (*eventos estressores*) e **H** (*CTSPC*).

4.2.1.2 *Questionário confidencial da mãe*

O questionário confidencial era aplicado após o questionário geral. A mãe era questionada sobre a capacidade de manusear o computador, assim como sobre a compreensão das questões. Caso não apresentasse dificuldades, o questionário era auto aplicado, período no qual a mãe permanecia sozinha na sala de entrevista. Se a mãe apresentasse dificuldade no uso com computador, o instrumento era aplicado na versão impressa e/ou com auxílio da entrevistadora. Nesse último caso, as questões eram lidas e a mãe orientada para a marcação das respostas. Este questionário era composto por cinco perguntas e baseou-se no instrumento *Alcohol Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST), sobre uma variedade de uso de substâncias, incluindo álcool, fumo e drogas ilícitas na vida e nos últimos três meses, bem como sobre a idade de experimentação da primeira substância (ANEXO 6).

4.2.2 Testes psicológicos aplicados à mãe ou responsável

4.2.2.1 WASI

A Escala *Wechsler* Abreviada de Inteligência (WASI) é um instrumento breve de avaliação da inteligência, aplicável a crianças de 6 anos a idosos de 89 anos de idade. Fornece informações sobre os Quocientes de inteligência (QI) Total, de Execução e Verbal, a partir de quatro subtestes (Vocabulário, Cubos, Semelhanças e Raciocínio Matricial), em um curto espaço de tempo. A escala ainda fornece a possibilidade de avaliação do QI Total com apenas dois subtestes (Vocabulário e Raciocínio Matricial). Este questionário foi aplicado à mãe biológica e social do(a) adolescente.

4.2.2.2 DAWBA

O DAWBA é um questionário dividido em duas partes: uma estruturada e outra aberta. Este instrumento propõe-se a fazer diagnósticos psiquiátricos segundo as classificações diagnósticas do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* 4ª edição (DSM-IV) e da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), em crianças e adolescentes de cinco a 17 anos de idade. O instrumento permite fazer o diagnóstico de Transtorno de Ansiedade de Separação, Fobia Específica, Fobia Social, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno do Estresse Pós-Traumático, Transtorno do Pânico e Agorafobia, Transtorno Obsessivo Compulsivo, Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, Transtorno de Oposição e Desafio, Transtorno de Conduta, Transtornos Alimentares (Anorexia nervosa, Bulimia nervosa, Transtorno de compulsão alimentar) e Transtorno de Tiques (Síndrome de *Tourette*, Tiques motores e Tiques vocais). Além disso, permite suspeitar de Transtorno Invasivo do Desenvolvimento e Transtorno Afetivo Bipolar. O questionário DAWBA foi aplicado na versão *on-line* e os dados estão depositados no *site* (www.dawba.com). Além disso, a versão *on-line* foi adaptada para uma versão em papel, para ser utilizada nas visitas domiciliares e nos momentos em que o acesso à internet não estivesse disponível. Este questionário foi aplicado ao responsável do(a) adolescente, preferencialmente à mãe.

4.2.2.3 MINI

Trata-se de uma entrevista diagnóstica de curta duração (15 a 30 minutos), que visa classificar os entrevistados de forma compatível com os critérios do DSM-V e da CID-10. Dentre os transtornos mentais avaliados pelo MINI, foram investigados: Episódio Depressivo Maior, Risco de Suicídio, (Hipo) mania, Agorafobia, Fobia Social,

Transtorno de Ansiedade Generalizada e Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.

4.2.3 Questionários aplicados ao(à) adolescente

4.2.3.1 Questionário geral do adolescente

O questionário aplicado ao(à) adolescente está apresentado no (ANEXO 7), sendo composto pelos seguintes blocos:

BLOCO A (*identificação*): composto por três questões, que incluíam a identificação do adolescente, nome da entrevistadora, data e horário do início da entrevista.

BLOCO B (*escola*): composto por oito questões, que continham informações sobre o desempenho do(a) adolescente na escola.

BLOCO C (*percepção do ambiente escolar*): composto por onze questões, que tratavam da percepção sobre o comportamento próprio e dos colegas na escola.

BLOCO D (*bullying*): composto por 23 questões, abordando agressões físicas e morais sofridas no ambiente escolar.

BLOCO E (*trabalho*): composto por 12 questões, tratando sobre trabalho e renda proveniente do trabalho.

BLOGO F (*lazer e tempo de tela*): composto por 22 questões, envolvendo atividades de lazer, como encontrar amigos, ouvir música, ir a festas, estudar outras línguas, ler livros e praticar alguma religião, além de assistir televisão, jogar em celular, *tablet* ou em *videogame*, durante a semana e finais de semana.

BLOCO G (*atividade física*): composto por 18 questões, que abrangiam uma lista de exercícios praticados fora do ambiente escolar, como o(a) adolescente se desloca para a escola e o tempo despendido para isso.

BLOCO H (*eventos estressantes*): composto por 23 questões, que abordavam a experiência dos adolescentes com possíveis eventos estressantes em sua vida, desde os 11 anos de idade; mais cinco questões sobre relação com os pais; uma questão relacionada ao bairro; sete relacionadas à sociedade e leis; e uma sobre a percepção de onde o(a) adolescente pensa estar neste momento de sua vida, em relação a outras pessoas no país.

BLOCO I (*escala de faces e percepção corporal*): a escala de faces era composta por uma questão, aplicada com o auxílio de uma figura que contém imagens de faces tristes e felizes, dentre as quais o(a) adolescente deve escolher qual mostra melhor como ele(a) se sentiu a maior parte do tempo no último ano. A percepção corporal foi avaliada por três questões aplicadas com o auxílio de uma figura, com imagens corporais, que vão do menor ao maior (mais magro ao mais obeso). O(A) adolescente respondia sobre a percepção corporal atual, além de sua satisfação com a mesma.

BLOCO J (*acidentes*): composto por duas questões sobre possíveis acidentes de trânsito sofridos após os 11 anos de idade.

BLOCO K (*saúde*): composto por 35 questões, envolvendo saúde geral, saúde bucal, utilização de serviços de saúde bucal, chiado no peito, dores de cabeça e fumo passivo.

BLOCO L (*sono*): composto por 20 questões sobre a qualidade e quantidade de sono percebida pelos(as) adolescentes (Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh, Escala de Sonolência de *Epworth*, Questionário de Cronotipo de Munique - MCTQ -, além de um questionário sobre insônia).

BLOCO M (*locus de controle*): composto por 12 questões sobre o locus de controle, que é o quanto o indivíduo acredita que ele mesmo, invés de forças externas, detém o controle sobre os desfechos que acontecem em sua vida.

BLOCO N (*autoestima*): composto por dez questões relacionadas a autoestima do(a) adolescente.

BLOCO O (*controle emocional*): composto por 16 questões, envolvendo controle de sentimentos e emoções.

BLOCO P (*sentimentos e comportamentos e autocontrole*): composto por 12 questões do instrumento *Inventory of Callous-Unemotional Traits*, para avaliação de traços de insensibilidade, e quatro questões sobre afetividade e autocontrole.

BLOCO Q (*namoro*): composto por quatro questões sobre relacionamentos amorosos.

BLOCO R (*menstruação*): apenas para participantes do sexo feminino, composto por seis questões sobre a menstruação, oito questões sobre dismenorrea e 14 sobre tensão pré-menstrual.

BLOCO S (*gravidez e filhos*): composto por seis questões, tratando sobre gestações e filhos.

BLOCO T (*comportamentos alimentares*): composto por 26 questões do instrumento *Eating Attitudes Test-26*, envolvendo transtornos alimentares.

BLOCO U (*café e chimarrão*): composto por sete questões sobre consumo de chimarrão e nove sobre consumo de café.

BLOCO V (*cortisol*): composto por oito questões, envolvendo informações sobre o cabelo do(a) participante, como corte e tratamentos químicos já realizados.

4.2.3.2 Questionário confidencial do(a) adolescente

O questionário confidencial era aplicado após o questionário geral. O(A) adolescente era questionado(a) sobre a capacidade de manusear o computador, assim como sobre a compreensão das questões. Caso não apresentasse dificuldade, o questionário era auto aplicado, período no qual o(a) adolescente permanecia sozinho(a) na sala de entrevista. Se apresentasse dificuldade no uso com computador, o confidencial era aplicado na versão impressa e se o(a) adolescente não fosse alfabetizado, as questões eram lidas pela entrevistadora, que orientava o(a) participante na marcação das respostas. O questionário aplicado está apresentado nos ANEXOS 8 e 9, sendo composto pelos seguintes blocos:

BLOCO A (*cigarros*): composto por cinco questões envolvendo consumo de cigarro e cigarro eletrônico.

BLOCO B (*álcool e drogas*): composto por quatro questões sobre consumo de bebidas alcoólicas e três questões baseadas no instrumento *Alcohol Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST), sobre uma variedade de uso de substâncias, incluindo álcool, fumo e drogas ilícitas, na vida e nos últimos três meses, bem como sobre a idade de experimentação da primeira substância.

BLOCO C (*justiça, brigas e violência*): composto por três questões sobre a polícia no Brasil; quatro sobre experiências de vitimização; três sobre brigas e outros comportamentos, que podem colocar jovens em problemas com a lei; 15 questões sobre situações, que poderiam já ter acontecido na vida do(a) adolescente, como roubar, arrombar casas ou carros e vender drogas; nove questões sobre brigas e violência; sete questões sobre relação do(a) adolescente com os pais e entre seus pais; e mais duas questões sobre separação dos pais.

BLOCO D (*situações na escola*): composto por 23 questões, abordando agressões físicas e morais perpetradas no ambiente escolar.

BLOCO E (*sexualidade*): composto por dez questões sobre orientação sexual, relações sexuais e desenvolvimento sexual, além de 20 questões sobre papéis de gênero.

BLOCO F (*relação intrafamiliar*): composto por sete questões, que envolviam relações no ambiente familiar, incluindo agressões, falta de alimentos e abuso sexual.

4.2.3.3 *Questionário de frequência alimentar*

O QFA era composto por 92 itens alimentares, contendo questões sobre frequência e quantidade de consumo semanal no último ano; onze questões sobre práticas alimentares; três sobre formas de perder ou ganhar peso; e uma sobre suplementação (ANEXO 10). O questionário semi-quantitativo continha as porções de consumo padronizadas e a frequência de consumo fechada/categorizada. Foram inseridas fotos com as porções médias de cada alimento, com o objetivo de tornar o *layout* do questionário mais atraente para os participantes, bem como para auxiliar na quantificação das porções.

O QFA era preenchido pelo(a) próprio(a) adolescente diretamente no computador, salvo aqueles com dificuldade para manusear o equipamento, os quais foram auxiliados pela supervisora do QFA.

4.2.3.4 CANTAB

Originalmente desenvolvido na Universidade de Cambridge, o *Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery* (CANTAB) inclui medidas altamente sensíveis, precisas e objetivas da função cognitiva, correlacionadas às redes neurais. Inclui testes de memória de trabalho, aprendizado e função executiva; memória visual, verbal e episódica; atenção, processamento de informações e tempo de reação; reconhecimento social e emocional, tomada de decisão e controle de respostas. O teste é independente do idioma, culturalmente neutro, não invasivo e não requer conhecimento técnico ou familiaridade prévia com computadores, tornando-o adequado para estudos com grandes amostras, em vários locais e diversos grupos de participantes. É auto aplicado e administrado utilizando um computador com uma tela sensível ao toque.

4.3 Equipamentos

4.3.1 Antropometria, pressão arterial e coleta de cabelo

Para realização das medidas antropométricas e aferição da pressão arterial nos(as) adolescentes, três equipamentos foram utilizados: um estadiômetro, fita métrica inextensível e esfigmomanômetro digital.

✓ *Estadiômetro*

Para aferição da altura foi utilizado o estadiômetro do modelo portátil *Harpender®*, com altura máxima de 2,06 m e precisão de 1 mm. Com ele foram mensuradas a altura em pé e sentada (altura do tronco) do(a) adolescente. Para a realização da medida do tronco, foi construído um assento com 75 cm de altura, o qual foi acoplado ao estadiômetro.

✓ *Fita métrica inextensível*

Para aferição das circunferências da cintura e abdominal, foi utilizada fita métrica inextensível da marca *CARDIOMED*, com comprimento total de 150 cm e precisão de 1 mm.

✓ ***Esfigmomanômetro digital***

A pressão arterial foi aferida com aparelho automático modelo HEM 705CPINT da marca *Omron*. Este aparelho era composto por um monitor e uma braçadeira pequena, uma média e uma grande. A braçadeira pequena foi utilizada em adolescentes com até 23 cm de circunferência braquial e a média, naqueles com a circunferência maior que este valor.

No aparelho digital HEM 742, a insuflação da braçadeira é automática e ocorre por meio de uma bomba elétrica. A deflação ocorre por meio de uma válvula ativa, de liberação de pressão automática. Este aparelho está capacitado para medir pressões entre 0 e 299 mmHg, pode ser utilizado em pessoas com arritmias cardíacas e foi validado clinicamente pela BHS (*British Hypertension Society*) e pela AAMI (*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*).

Além disso, também foi realizada a coleta de uma mecha de cabelo dos (as) adolescentes. Para a realização desta coleta, os materiais utilizados foram:

✓ ***Material de coleta, uso coletivo:***

1. Tesoura
2. Folhas papel toalha
3. Álcool 70%
4. Clipe de escritório (1)
5. Etiquetas de identificação do participante
6. Medidor de coleta, retângulo de papel furado para padronizar a quantidade de cabelo a coletar
7. Coletor de lixo contaminado
8. Secador de cabelo
9. Kit de coleta de uso individual

✓ ***Kit para coleta, uso individual e descartável:***

1. Saco Ziplock
2. Cartão de papel
3. Papel toalha

4. Pente e cliques de cabelo (2)
5. Clipe de escritório (1)
6. Barbante

4.3.2 BodPod

O BodPod® *Gold Standard – Body Composition Tracking System* é um pletismógrafo que permite calcular o volume corporal através do deslocamento de ar. O valor da densidade corporal é obtido por meio da relação existente entre a massa corporal e o seu volume (estimado pelo deslocamento de ar em uma câmara fechada). A massa corporal (em Kg) é obtida através de uma balança acoplada ao sistema, enquanto o volume (em L) é mensurado pelo pletismógrafo. O peso dos participantes foi obtido a partir da balança do BodPod.

4.3.3 DXA

O Densitômetro Ósseo com Raio-X baseado em enCORE (modelo Lunar Prodigy – marca GE Healthcare®) avalia a composição corporal através do princípio de atenuação de raios X pelos diferentes tecidos corporais. Quando um feixe de raios X ultrapassa o indivíduo, a intensidade com que chega ao outro lado está relacionada com a espessura, densidade e composição química dos tecidos. A atenuação desses raios pelo osso, tecido magro e tecido adiposo ocorre de forma diferente, refletindo suas densidades e composição química.

4.3.4 Acelerômetro

Os acelerômetros utilizados neste acompanhamento eram da marca *ActiGraph*, modelos *wGT3X-BT* e *wActiSleep-BT*, ambos com posicionamento de uso no punho, à prova d'água e de mesma captação de dados. Mais adiante, a seção 6.2.6 descreverá toda a logística envolvendo a acelerometria.

5. MANUAIS DE INSTRUÇÃO

Os manuais de instruções do estudo serviram como guia e apoio para o pessoal de campo. Foram elaborados manuais de instruções para auxiliar as entrevistadoras (ANEXO 11), supervisoras do QFA (ANEXO 12) as antropometristas (ANEXO 13 e 14) e as operadoras do BodPod (ANEXO 15) e do DXA (ANEXO 16). Os manuais referentes aos questionários continham instruções e respostas às possíveis dúvidas específicas de

cada uma das questões. Além disso, traziam orientações gerais sobre material básico, rotina de trabalho, apresentação pessoal e postura, entre outras. Os manuais referentes à antropometria e operação dos equipamentos continham o passo-a-passo para sua aplicação. Exemplares dos manuais eram mantidos em cada sala de exame e na recepção da clínica, além de estarem disponíveis em formato PDF, em todos os computadores das entrevistadoras.

6. TRABALHO DE CAMPO

6.1 Início do trabalho de campo

O trabalho de campo deste acompanhamento teve início no dia 20 de novembro de 2019, no turno da manhã, nas dependências do prédio B do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) Dr. Amilcar Gigante da UFPel. O atendimento aos adolescentes e suas mães ou responsáveis foi realizado de segunda-feira a sábado, em dois turnos de trabalho de seis horas corridas, os quais aconteciam das 8h30 às 14h30 horas (turno da manhã) e das 14h30 às 20h30 horas (turno da tarde).

6.2 Logística do trabalho de campo

A coleta de dados deste acompanhamento ocorreu no CPE Dr. Amilcar Gigante, uma infraestrutura única no país, voltada para a operacionalização de pesquisas de base populacional na área da saúde. Todos(as) os(as) adolescentes e seus responsáveis eram convidados a comparecer na clínica, mediante agendamento telefônico. Inicialmente, foram agendados 15 adolescentes por dia, três em cada turno de trabalho. Esse número foi sendo aumentado gradativamente, até chegar a 15 agendamentos por turno de trabalho, com o objetivo de que, a cada dia, pelo menos 22 adolescentes visitassem a clínica.

6.2.1 Recepção dos(as) adolescentes

O(A) adolescente agendado(a), ao chegar à clínica, era atendido(a) na recepção. Neste momento, eram solicitados documentos, para confirmação de dados cadastrais do adolescente (carteira de identidade ou certidão de nascimento) e do responsável (carteira de identidade e CPF ou carteira de trabalho). O nome do(a) adolescente era conferido na lista de agendamentos, que constava no sistema (ANEXO 17). No caso do(a) adolescente ter comparecido à clínica sem ter sido agendado(a), os dados eram localizados no sistema e o cadastro era realizado. Ainda na recepção, adolescente e responsável recebiam

crachás, previamente elaborados, para usar durante todo o tempo que estivessem na clínica. Este crachá, além de identificar o(a) participante e seu responsável, especificava todos os locais (estações), pelos quais ambos deveriam passar, garantindo desta forma que os acompanhados respondessem a todos os questionários e realizassem todos os exames previstos. Os crachás eram diferenciados pelo tamanho, sendo a versão menor da mãe ou responsável e a maior, do(a) adolescente (ANEXO 18). Além disso, ambos recebiam uma pulseira de identificação, que continha um código de barras para leitura nas salas de entrevistas e nos exames, evitando, assim, erros de digitação dos números de identificação (ID).

Após a entrega dos crachás e pulseiras, a recepcionista contatava (o)a responsável pelo fluxo das estações (também denominado de “fluxo da frente”), para solicitar disponibilização de entrevistadora e/ou psicólogo(a). O responsável pelo fluxo conduzia o(a) participante e seu responsável até a entrevistadora, que realizava a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), destinado ao responsável (ANEXO 19) e do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), ao adolescente (ANEXO 20). Todos os termos continham a identificação do(a) adolescente e do responsável. Ao final do TCLE constava uma lista com os procedimentos (questionários e exames), que seriam realizados e o(a) adolescente e seu responsável deveriam marcar um “X” em todos os que estivessem de acordo em realizar. Se o(a) adolescente ou o responsável recusassem ou relatassem possuir algum impedimento para a realização dos exames, a pós-doutoranda ou o doutorando de plantão era chamado para tentar reverter a recusa ou confirmá-la.

Após assinatura dos termos, o(a) adolescente era encaminhado para a entrevista, CANTAB, QFA ou para os equipamentos (BodPod e DXA) e o responsável, para entrevista ou psicólogo(a). A clínica ficou dividida em dois espaços: a parte da frente era composta por salas de entrevistas (3), sala de psicólogos(as) (3) e sala de aplicação do QFA (1), enquanto a parte dos fundos era composta por salas de entrevistas (2), sala de psicólogos (2) e sala de exames (3). Cada espaço era controlado por uma pessoa com acesso a um computador (fluxo de frente) e um *netbook* (fluxo de fundos). Portanto, quatro pessoas (duas por turno) estavam responsáveis por esse controle. Na parte das entrevistas, eram aplicados os seguintes instrumentos: questionário geral da mãe, confidencial da mãe, questionário do(a) adolescente, questionário confidencial do adolescente, QFA e CANTAB. Com os(as) psicólogos(as) eram aplicados o WASI, MINI e DAWBA. Na parte dos equipamentos eram realizados os seguintes exames: pletismografia por deslocamento de ar (BodPod), densitometria (DXA), antropometria

(altura em pé, altura sentado, circunferência da cintura e quadril), coleta de cabelo e pressão arterial. A ordem com que os(as) adolescentes e seus responsáveis realizavam o acompanhamento era controlada pelos responsáveis pela distribuição (fluxo) da clínica. Entre a realização dos exames e dos questionários, era oferecido aos entrevistados (adolescente e responsável), na sala de recreação (entretenimento), supervisionada pelo responsável pelo fluxo da frente, um lanche (sanduíche e suco) e acesso a televisão e *Wi-fi*.

6.2.2 Entrevistas

No “fluxo” das entrevistas, priorizava-se o encaminhamento dos adolescentes, tendo visto o tempo despendido entre os instrumentos. Em cada uma das cinco salas de entrevista de questionário geral e confidencial, as questões eram registradas em computadores de mesa. Em momentos de fluxo intenso, os questionários também eram aplicados pela pós-doutoranda ou pelo(a)doutorando(a) de plantão. O QFA era aplicado em uma sala contendo quatro computadores e o seu preenchimento era supervisionado. Excepcionalmente, em caso de algum problema no sistema, as entrevistas e o QFA eram realizadas em papel. No caso de dúvidas das entrevistadoras em relação as respostas do(a) entrevistado ou qualquer outra situação, a pós-doutoranda ou o(a) doutorando(a)de plantão eram consultados.

6.2.3 Psicólogos(as)

No “fluxo” dos psicólogos(as), após a chegada na clínica, a prioridade era que todas as mães ou responsáveis fossem diretamente encaminhados, tendo em vista o tempo despendido na aplicação dos instrumentos de saúde mental. Em cada uma das cinco salas de psicólogos(as), os instrumentos eram aplicados em computadores de mesa.

6.2.4 CANTAB

No “fluxo” do CANTAB, havia uma divisão da aplicação entre entrevistadoras, psicólogos(as) e monitoras do QFA. Em momentos de fluxo intenso, também era aplicado pela pós-doutoranda ou pelo(a)doutorando(a) de plantão. A aplicação era realizada com auxílio de um *tablet* (iPad 7ª geração) e a orientação era que fosse uma das primeiras etapas a ser realizada pelo(a) adolescente na clínica.

6.2.5 Equipamentos

No “fluxo” dos exames, o(a) participante era convidado a colocar uma roupa adequada, fornecida pela equipe da Coorte 2004, em um vestiário próprio para isso. Era necessária a retirada de qualquer objeto de metal para a realização dos exames de composição corporal. Com a troca de roupa, os(as) adolescentes deixavam seus pertences em armários com cadeados e percorriam todos os exames de posse de sua chave. Durante o fluxo na parte dos equipamentos, eram encaminhados apenas dois participantes por vez, sendo atendidos alguns pré-requisitos, conforme segue:

✓ *BodPod*

Juntamente com a antropometria, era o aparelho com prioridade, ou seja, dentre os dois participantes encaminhados para os exames, um deles realizava a primeira medida neste equipamento. Nesta estação era medido o peso e a altura em pé do(a) adolescente, sendo essa última anotada no crachá, para ser utilizado no DXA. Após a realização da pletismografia, o(a) adolescente era encaminhado(a) para o DXA e, em seguida, para a antropometria. No BodPod, o(a) participante permanecia dentro do aparelho (uma câmara fechada), por alguns segundos, e era orientado(a) a não se mexer. Era obrigatório o uso de uma touca de natação. O exame não era realizado em jovens cadeirantes nem em adolescentes grávidas ou com suspeita de gravidez.

✓ *Antropometria, pressão arterial e coleta de cabelo*

Juntamente com o BodPod, esta era a estação com prioridade, ou seja, dentre os dois participantes encaminhados para os exames, um deles era encaminhado para a antropometria. Nesta sala, eram aferidas medidas de pressão arterial, circunferência da cintura e do quadril, altura em pé e altura sentada e, também, era coletada uma mecha de cabelo. Havia duas antropometristas e cada uma coletava todas as medidas uma vez. Quando ocorria diferença entre as medidas das antropometristas acima do erro aceitável, ambas realizavam uma segunda medida. O erro aceitável para cada medida era 0,7 cm para altura sentada e altura em pé, e 1 cm para a circunferência da cintura e quadril. A medida da pressão arterial era aferida duas vezes, a primeira ao início das medidas, após cinco minutos de descanso, e a segunda, após dois minutos da primeira medida. Normalmente, a coleta da mecha de cabelo era a última etapa a ser realizada nesta estação. Nesta etapa, adolescentes grávidas ou com suspeita de gravidez não realizavam a medida

das circunferências (cintura e quadril). Após a realização da antropometria, o(a) adolescente era encaminhado(a) para o BodPod.

✓ DXA

Nesta etapa o(a) adolescente deitava-se em uma cama anexa ao aparelho e era realizado um *scanner* do fêmur, coluna e de corpo inteiro. O(A) adolescente não poderia ter pinos/placas nos ossos ou estar usando qualquer objeto de metal, com exceção de aparelho ortodôntico. Este equipamento exigia que as medidas de peso e altura tivessem sido aferidas previamente. O exame não era realizado em jovens cadeirantes, jovens com deformidades osteoarticulares, aqueles com peso >120 kg nem em adolescentes grávidas ou com suspeita de gravidez. Os jovens com altura >192 cm faziam apenas coluna lombar e fêmur (não realizavam corpo inteiro). O DXA era a última etapa para ambos os adolescentes encaminhados a cada vez para os exames (Figura 1).

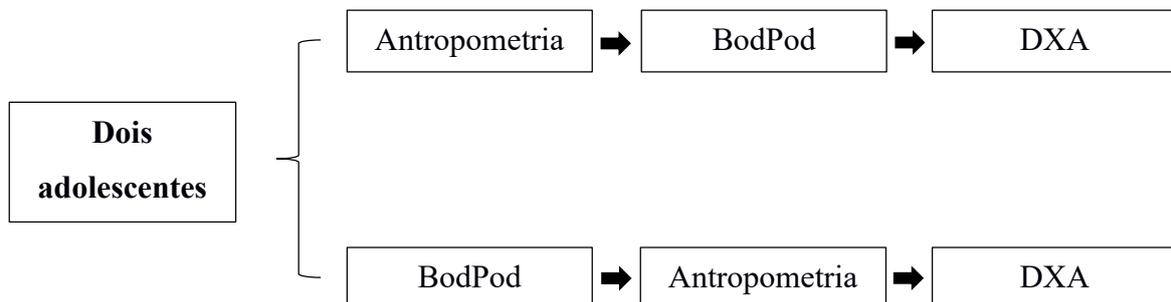


Figura 1. Fluxo ideal dos equipamentos.

6.2.6 Acelerometria

Ao término dos exames e questionários, o(a) adolescente era encaminhado(a) à recepção, onde era convidado a colocar um acelerômetro no punho de seu braço não dominante. Tal aparelho era utilizado para mensuração objetiva de atividade física, sendo responsável pela captação de movimentos corporais, para estimar os padrões de atividade física dos(as) participantes.

6.2.6.1 Acelerômetros

Durante o acompanhamento, estavam disponíveis um total de 149 acelerômetros do modelo *Actigraph wGT3X-BT* (Figura 2). Em geral, todos os acelerômetros eram

utilizados semanalmente em virtude do fluxo diário de participantes ser compatível com o total de acelerômetros. A preparação dos aparelhos era realizada através do *software Actilife 6.11.6.623 BETA*, assim como a conferência inicial dos dados (Figura 3).

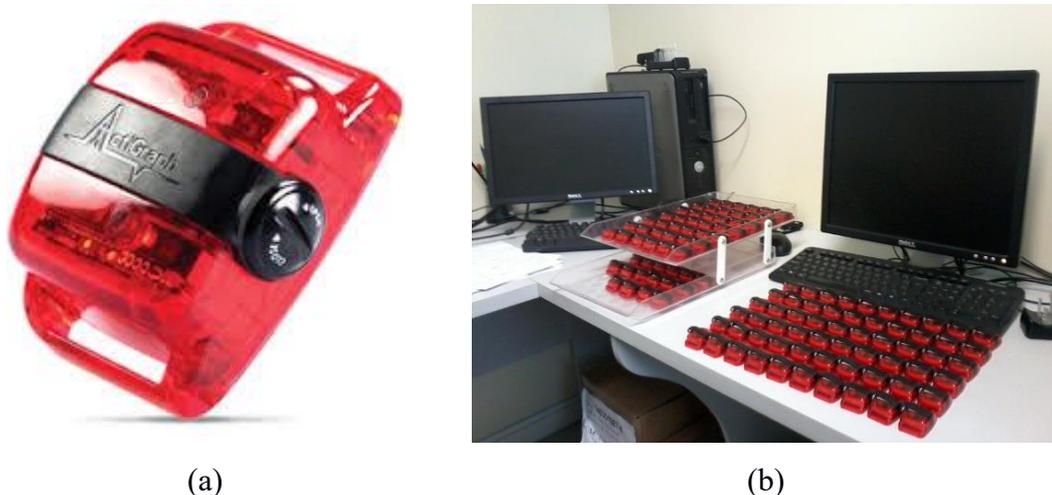


Figura 2. Acelerômetro *ActiGraph* – modelo *wGT3X-BT*.



Figura 3. Acelerômetros conectados para *download* dos dados.

6.2.6.2 Logística de coleta de dados

Os aparelhos eram programados para captar dados a partir das 14 horas, para acelerômetros colocados no turno da manhã, e a a partir das 20 horas, para aqueles colocados no turno da tarde. Os acelerômetros colocados nas segundas-feiras eram retirados na segunda-feira da semana subsequente, e da mesma forma para os demais dias da semana. Assim, a captação dos dados totalizava sete dias completos, restando ao menos seis dias completos para análise. Devido ao número total de acelerômetros, não era

possível a utilização dos equipamentos por oito dias, fato que resultaria em sete dias completo de dados.

Os acelerômetros eram preparados para captar os dados com uma frequência de detalhamento das informações de 60Hz. Para identificação dos dados e registro dos usuários, eram usadas na preparação do acelerômetro as seguintes informações: (a) número identificador (ID); (b) primeiro nome e as iniciais do sobrenome; e (c) data de nascimento. Além destas práticas, para a preparação dos acelerômetros, a bateria dos mesmos era carregada até 100% de sua capacidade antes de serem acionados. Em caso de preparação de acelerômetro com urgência, era garantido que a carga estivesse em pelo menos 90%. As principais instruções sobre a preparação dos acelerômetros constam no manual de instruções da acelerometria (ANEXO 21).

Diariamente, a lista de agendamentos referente a cada turno era enviada para o responsável pela acelerometria. Com o ID e iniciais do nome do(a) adolescente, o aparelho era configurado em um *software* e, depois de ativado para uso, era levado para a recepção, a fim de ser colocado no punho dos jovens. Se um(uma) adolescente chegasse à clínica para ser atendido(a) sem agendamento, realizava-se a programação enquanto eram realizados os exames e as entrevistas. Na recepção, as recepcionistas faziam o registro do número específico do acelerômetro, no cadastro do(a) adolescente no REDCap.

Na recepção, o(a) adolescente era orientado(a) sobre o uso do acelerômetro e era entregue um guia de orientações sobre a utilização do equipamento (ANEXO 22). Era perguntado ao adolescente qual era a sua mão dominante, sendo o aparelho colocado no braço não dominante e com os pinos voltados para os dedos. A recepcionista orientava o(a) adolescente sobre a utilização durante as 24 horas do dia, inclusive no banho, para dormir e em qualquer outra atividade. A necessidade de que o monitor de atividade física fosse utilizado o máximo de tempo possível, dentro do período determinado, era sempre ressaltada. A primeira etapa para colocação do acelerômetro pela recepcionista, era questionar o(a) adolescente e seu responsável sobre o melhor turno para retirada do mesmo (que seria na semana seguinte à colocação) e confirmar telefones de contato e o endereço para retirada do equipamento. Estas informações eram preenchidas no REDCap. Após, era colocado o aparelho no(a) adolescente, explicado o uso e entregue as instruções, que continham data e turno para retirada e o telefone para contato, em caso de alguma dúvida ou problema no decorrer da semana. Depois deste processo, os responsáveis pela acelerometria (Tiago Silva e Calebe Borges) preparavam uma planilha de coleta, que era

entregue ao coletador (*motoboy*), para o recolhimento dos aparelhos no local e turno marcados previamente. Esta planilha era entregue ao coletador um dia antes das coletas. Era orientado que o acelerômetro fosse retirado do punho pelo coletador, sempre que possível.

Posteriormente ao recolhimento do aparelho pelo coletador e chegada do acelerômetro na clínica do CPE, eram iniciados os procedimentos de *download* dos arquivos registrados nos monitores, em um computador exclusivo para este fim. Imediatamente a chegada dos arquivos, os mesmos eram checados e, em seguida, enviados para o *Dropbox* da Acelerometria da Coorte 2004 para armazenamento e backup. Sempre após o *download*, o acelerômetro tinha sua bateria recarregada para ser disponibilizado para uso novamente.

Com os dados no computador, o *software* utilizado permitia ver quantos dias o(a) adolescente havia utilizado o acelerômetro. Para o dado ser considerado válido neste momento, o(a) participante deveria ter mantido o aparelho fixado no punho por um período equivalente a, no mínimo, três dias, do contrário este dado precisaria ser novamente coletado. Nos casos em que os acelerômetros retornavam com menos de três dias de uso, o(a) adolescente era considerado como pendente para acelerometria e a equipe responsável por contatá-lo(a) e realizar o agendamento para a colocação do aparelho novamente. Nesta situação, a colocação era feita pelo mesmo *motoboy* que realizara o recolhimento do aparelho. Caso o(a) adolescente não aceitasse recolocar, o mesmo passava a ser contabilizado como perda. Ressalta-se que essa recolocação era realizada apenas quando havia equipamentos disponíveis de forma que não fossem atrapalhar as coletas dos participantes que estava visitando a clínica de pesquisa.

Algumas exceções ocorriam quando o participante não podia colocar o acelerômetro na semana em que visitou a clínica. Isto ocasionava, também, uma pendência. Nestes casos, o participante recebia uma ligação, para agendar um horário em que o acelerômetro pudesse ser levado em sua casa para colocação. Nesta situação, a colocação era feita pelo mesmo *motoboy* que recolhia os aparelhos. Ainda, outras situações caracterizavam o(a) adolescente como atendendo algum critério de exclusão para esta etapa específica do estudo, sendo as seguintes: (a) incapacidade de deslocar-se caminhando de um lugar ao outro; (b) distúrbios mentais nos quais o(a) adolescente não permitia a colocação do aparelho; e (c) não residir em Pelotas, exceto moradores de Capão do Leão (cidade vizinha) e quando os(as) adolescentes estavam de férias na cidade e permaneceriam o tempo necessário para a retirada.

Para fins de controle de qualidade, o banco de dados era verificado periodicamente, juntamente com a planilha de controle e o banco de dados da acelerometria. A partir dessa rotina, eram identificados e corrigidos possíveis problemas na programação dos acelerômetros ou pendências e inconsistências. Além disso, mensalmente, era realizado um monitoramento em relação ao número de elegíveis, dados coletados, acelerômetros em uso no momento, pendências de colocação, perdas e recusas.

Os dados foram analisados de forma padronizada em comparação a outras coortes com a utilização do pacote de Análise GGIR no *Software R*. As análises incluíram a combinação de atividade física, comportamento sedentário e sono (parte 5 do código de análise GGIR). A versão do GGIR utilizada nesta análise foi 2.2-0 e um relatório específico sobre as análises está disponível com o gerente dos bancos de dados da Coorte de 2004.

O total de dados analisados foi de 1.531, mas durante o processo de análise alguns arquivos apresentaram problemas durante a detecção (ex: períodos de mensuração muito curtos, etc). Neste acompanhamento, 10 arquivos apresentaram problemas de processamento. Foram excluídos do banco também um total de 14 indivíduos que apresentaram problemas em termos de padrões de atividade física não compatível com o movimento humano, que não tinham pelo menos um ciclo de 24 horas e com erro de calibração $> 0,02$.

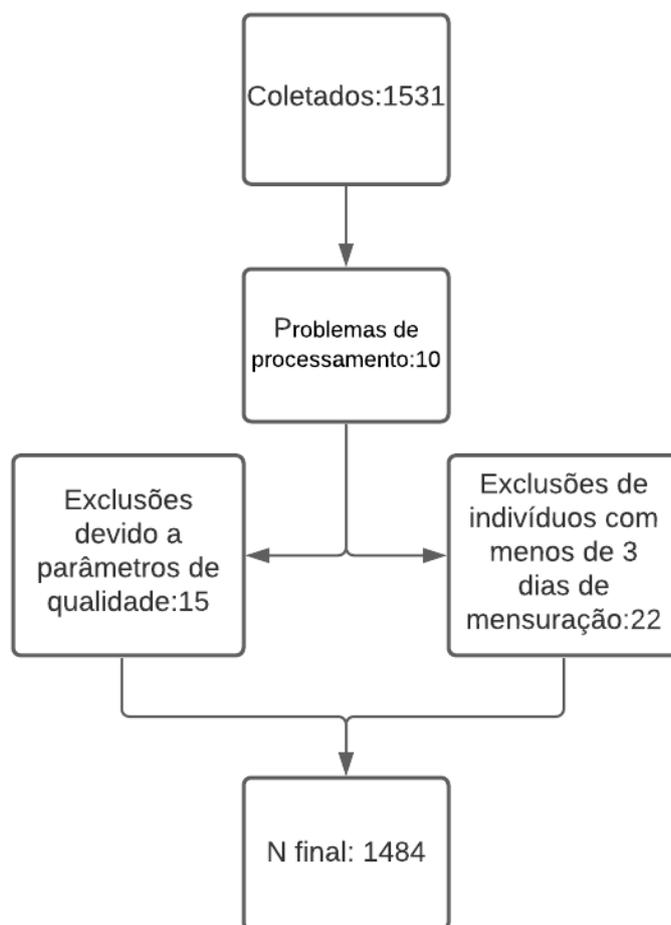
Todos os dados também tiveram seus *plots* visualizados a fim de identificar qualquer padrão anormal. Foram identificados apenas um *plot* com padrão anormal, e esse indivíduo foi excluído nesta etapa.

Para obtenção das médias semanais é importante verificar a confiabilidade dos dias ao longo da semana. Para isso realizamos o teste *Spearman-Brown Prophecy*. Procurou-se equilíbrio entre o valor de confiabilidade ideal (0.70 ou mais) e a perda de indivíduos na amostra. Variáveis de sono frequentemente tem menor confiabilidade em relação as de atividade física. Neste sentido decidiu-se excluir participantes com menos de três dias de mensuração. Assim, 22 indivíduos foram excluídos da amostra nesta etapa. Abaixo segue os valores de *Spearman-Brown Prophecy* para dias nas variáveis testadas.

Quadro 1. Spearman-Brown Prophecy de acordo com número de dias.

Variável	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias
Tempo total de sono	0.12	0.15	0.18	0.21
Janela de tempo de sono	0.07	0.09	0.11	0.13
AFMV (sem bout)	0.73	0.78	0.82	0.84
AFMV (bout 5 min)	0.66	0.72	0.77	0.80
AFMV (bout 10 min)	0.61	0.68	0.72	0.76

Assim, o N total com informação de 24h no acompanhamento da Coorte de 2004 aos 15 anos foi 1.484. A Figura 4 apresenta o fluxograma do acompanhamento de acordo com coleta e análise.

**Figura 4.** Fluxograma de coleta e análise coorte de 2004 -15 anos. Análise 2021.

Por fim, torna-se importante fazer algumas observações importantes para futuros pesquisadores(as) que irão utilizar esses dados:

1) Nossas análises são conduzidas considerando a janela de um dia do momento que o indivíduo acorda até o próximo momento que ele acorda (*wake to wake*). Sendo assim, podemos ter ciclos com menos ou mais de 24 horas.

2) Variáveis de ENMO e ritmo (*interdaily stability e intradaily variability*) não são disponibilizadas na parte 5 do GGIR. Por esse motivo são obtidas nos arquivos `part2_summary` e, portanto, tem janela da meia noite à meia noite.

3) Variáveis de comportamento sedentário sempre precisam de cautela na interpretação pois nossas medidas são baseadas somente em aceleração e não incluem medida de postura que faz parte da definição de comportamento sedentário.

4) As variáveis relativas a períodos de inatividade sustentada geradas pelo GGIR utilizam critério de bout diferente das de atividade física. Para estas variáveis o código exige que o indivíduo esteja 90% do *bout* estabelecido em comportamento inativo. Além disso, os bouts para inatividade das análises padrão são de 10, 20 e 30 minutos. Por esses motivos as variáveis de inatividade geradas pelo pacote não são um simples complemento das variáveis de atividade física e sim um período de inatividade bem mais exigente e com definições diferenciadas.

5) Uma variável de inatividade complementar a atividade leve (menos que 50mg) utilizando mesmos parâmetros da atividade física sem bout foi construída (`inat_complement/inat`). Essa variável consiste em toda atividade com intensidade inferior a 50 mg realizada fora da janela do tempo de sono.

6) Embora variáveis de sono tenham sido geradas, é importante ressaltar que a validação do presente algoritmo foi conduzida em uma amostra de adultos. As estimativas, embora sejam compatíveis com outras marcas, modelos e algoritmos de acelerômetro para esta idade, não são oriundas de métodos com validade testada.

7) Informações completas sobre processamento, dicionário de variáveis e como citar o GGIR: <https://cran.r-project.org/web/packages/GGIR/vignettes/GGIR.html>.

6.2.7 Encerramento da visita

Antes de deixar a clínica o(a) adolescente recebia uma ajuda de custo pelo seu deslocamento (R\$ 50,00), entregue ao seu responsável após a assinatura de um recibo do valor (ANEXO 23). O(A) adolescente ou seu responsável poderiam solicitar atestados para comprovar falta na escola e/ou trabalho, o qual era prontamente fornecido. Tais

documentos (ANEXO 24) ficavam à disposição na recepção e eram assinados pela coordenadora de campo. Alguns resultados de exames também eram fornecidos ao final, como peso, altura, pressão arterial e o percentual de gordura medido pelo BodPod (ANEXO 25).

6.2.7.1 Tempo de permanência na clínica

O tempo médio que os jovens permaneciam na clínica variou do início à metade do trabalho de campo (Figura 5). Inicialmente, os jovens ficavam, em média, 3h 54 min. Na metade do campo, a média de tempo foi de 3h 53 minutos, atingindo seu menor tempo na 10ª semana, quando o tempo de permanência foi reduzido para 3h 37 min (uma diferença de 16 minutos, em relação à primeira semana). Na última semana de campo, os participantes permaneceram na clínica, em média, 3h 46 min (Figura 5). Na Tabela 2 são apresentadas as médias de tempo despendido em cada estação.

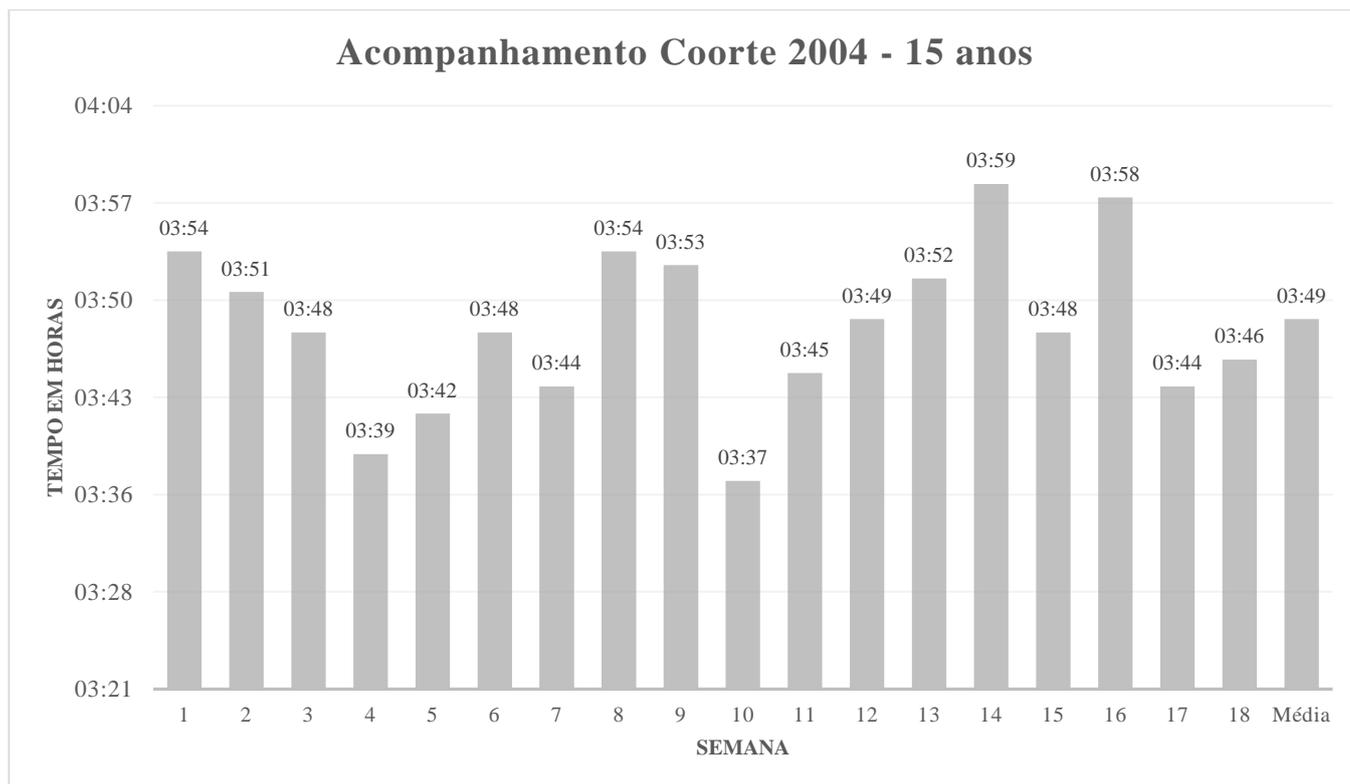


Figura 5. Tempo médio (em horas) de permanência dos participantes na clínica, por semana, no acompanhamento dos 15 anos.

Tabela 2. Tempo médio gasto por estação na Clínica do CPE.

ESTAÇÃO	MÉDIA DE TEMPO
<i>MÃE</i>	
Questionários – tempo total	20 min
Geral	17 min
Confidencial	3 min
Saúde mental – tempo total	1h 28 min
DAWBA	42 min
WASI	36 min
MINI	10 min
Tempo total da mãe	1h 48 min
<i>ADOLESCENTE</i>	
Questionários – tempo total	1h 26 min
Geral	47 min
Confidencial	17 min
QFA	22 min
Equipamentos – tempo total	34 min
Antropometria, pressão arterial e coleta de cabelo	15 min
BodPod	7 min
DXA	12 min
Teste Psicológico (CANTAB) – tempo total	39 min
Tempo total do adolescente	2h 40 min

6.2.8 Estratégias de busca dos(as) adolescentes

6.2.8.1 Rastreamento de endereços não encontrados

Durante o trabalho de campo, três rastreadores trabalharam na localização dos domicílios daqueles adolescentes que não tinham telefone/contato. Inicialmente, apenas uma rastreadora era responsável por essa tarefa, mas, em seguida, ela solicitou afastamento da função e outra pessoa foi contratada. Ao final do trabalho de campo, houve a necessidade de contratar mais um rastreador.

Com base em um levantamento dos endereços dos acompanhamentos anteriores, os rastreadores deslocavam-se até estes endereços, do mais antigo aos mais recentes,

registrados em uma folha de rosto. Uma vez localizado o adolescente, os rastreadores deixavam um informativo em sua casa ou na residência de algum familiar e, em alguns casos, contatavam o CPE para que já fosse realizada a atualização dos dados cadastrais e agendamento da visita.

6.2.8.2 Divulgação na imprensa local e redes sociais

Com o objetivo de divulgar o acompanhamento dos 15 anos da Coorte de 2004 e incentivar a participação dos(as) adolescentes no estudo, foi realizada a divulgação do acompanhamento dos 15 anos no perfil da coorte no *Facebook* (<https://www.facebook.com/coorte2004/?fref=ts>).

6.2.8.3 Jovens residentes em outros municípios e entrevistas telefônicas

Alguns adolescentes estavam residindo fora da cidade de Pelotas. Para esses participantes, era feita a proposta de agendarem a visita à clínica durante as festas de final de ano, férias escolares ou ainda, durante o feriado de carnaval. Estas foram as principais datas em que foi possível entrevistá-los.

7. SUBESTUDO DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

Este estudo, coordenado pela Dra. Simone Karam, teve por objetivo reavaliar os indivíduos identificados com deficiência intelectual (DI) e avaliar indivíduos com possível transtorno do espectro autista (TEA), pertencentes à Coorte 2004. Os participantes passaram por avaliação clínica e coleta de sangue ou de saliva, assim como seus pais, caso necessário.

O indivíduo caracterizado como “especial” em etapas anteriores, era convidado a ser reavaliado. Indivíduos não caracterizados anteriormente como “especiais”, porém cujos pais solicitaram avaliação por suspeita de DI ou TEA, passaram então por avaliação genético-clínica que incluía anamnese, exame físico e dismorfológico e avaliação do comportamento adaptativo. Em caso de ficar caracterizado como uma das duas condições já referidas, o indivíduo era incluído no estudo. Na clínica, uma sala foi reservada para avaliação pela Dra. Simone e para a coleta do material biológico. Inicialmente, 164 indivíduos foram selecionadas para a avaliação genética, dos quais 107 foram avaliados entre os meses de janeiro a março de 2020.

Após análise, os participantes e suas famílias eram chamados para aconselhamento genético e orientações.

8. SITUAÇÕES ADVERSAS E ALTERAÇÕES NA CONDUTA

- ✓ **DXA estragou:** O equipamento apresentou problemas entre 16 e 28 de janeiro de 2020, impedindo a realização dos exames. Um total de 231 adolescentes compareceram à clínica neste período e foram perdidas para o exame.
- ✓ **Mudança na aplicação do CANTAB:** Inicialmente, era aplicado apenas por psicólogos, após, para diminuir o tempo de permanência dos(as) adolescentes na clínica e melhorar o aproveitamento da equipe, entrevistadoras, supervisoras do QFA e doutorandos também passaram a aplicar este instrumento.
- ✓ **Mudança na aplicação dos instrumentos de Saúde Mental:** Em setembro de 2019, em reunião anterior ao início do trabalho de campo, decidiu-se que todos os instrumentos de Saúde Mental seriam aplicados a todas as pessoas que estivessem acompanhando o(a) adolescente. Porém, em uma reunião realizada em fevereiro, os coordenadores decidiram que o MINI e o WASI seriam aplicados apenas às mães biológicas e sociais. Após retomada do assunto e avaliação do mesmo em uma reunião realizada em março, o grupo decidiu que o WASI deveria ser aplicado somente as mães biológicas, o MINI para mães biológicas ou sociais e o DAWBA, a todos que estivessem acompanhando o(a) adolescente.
- ✓ **Mudança na aplicação do confidencial do responsável:** O questionário confidencial também sofreu alterações. No início do campo, era aplicado a todas as pessoas que estivessem acompanhando o(a) adolescente. Em reunião realizada em fevereiro, os coordenadores solicitaram excluir as informações dos confidenciais respondidos por pais ou outro responsável, que não fosse à mãe biológica ou social. Em uma reunião realizada em março, os coordenadores reafirmaram que este instrumento deveria ser aplicado apenas para as mães biológicas e sociais.
- ✓ **Segundo treinamento de Saúde Mental:** De 06 a 10 de janeiro de 2020, devido às diversas solicitações de desligamento, foi necessário realizar um novo treinamento para aplicação dos instrumentos sobre Saúde Mental. Pelo edital contemplado pela Fundação Delfim Mendes Silveira, havia dez bolsistas na suplência, porém, sem treinamento específico para todos os instrumentos de saúde mental. Desta forma, era necessário deixá-los aptos para o trabalho de campo, em

caso de futura contratação. Outro motivo para a realização deste treinamento foi a necessidade de contratação de dois novos psicólogos, por uma segunda fonte de recursos financeiros, para poder aumentar o fluxo do campo e não sobrecarregar os psicólogos, que estavam atuando naquele momento.

9. CONTROLE DO ANDAMENTO DO TRABALHO DE CAMPO

Um controle semanal da evolução do trabalho de campo era realizado por meio de um relatório elaborado pela pós-doutoranda supervisora. Esse relatório continha um resumo da produção a cada sete dias, sempre contabilizando os dados de segunda à sábado. Neste arquivo, era apresentado o número acumulado e por semana de participantes acompanhados. Esse conteúdo era enviado semanalmente, preferencialmente na segunda-feira, para informar aos pesquisadores, doutorandos e demais envolvidos, sobre o andamento do trabalho de campo (Figura 6).

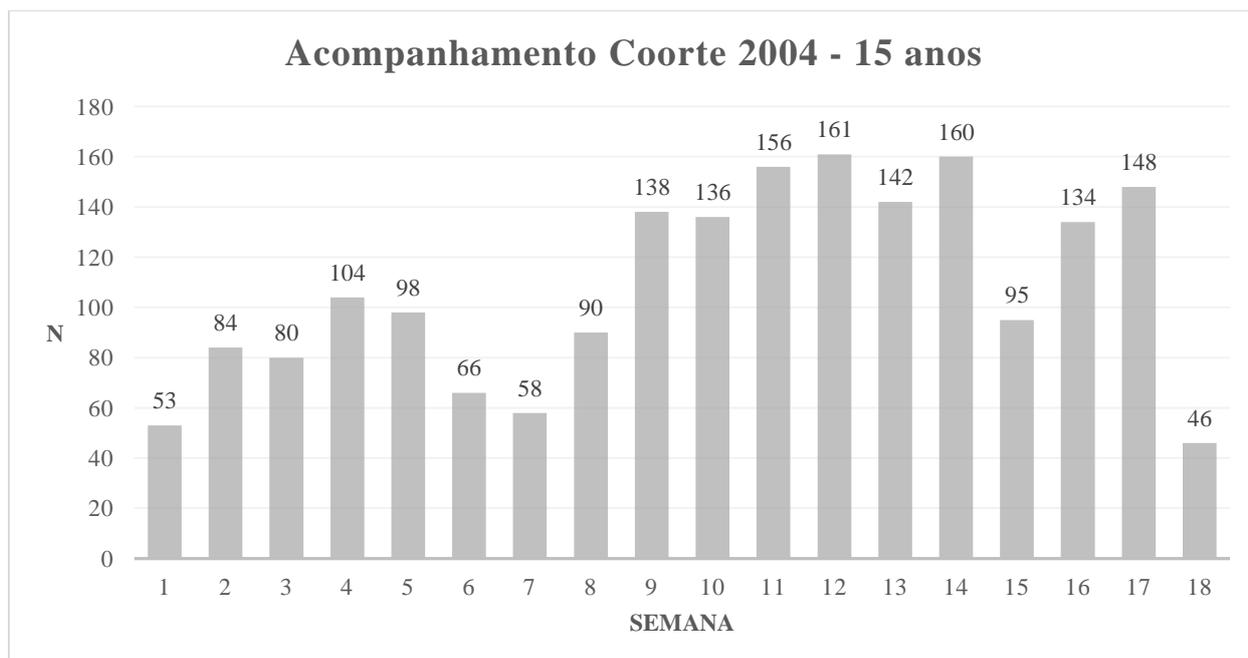


Figura 6. Panorama semanal do número de acompanhados aos 15 anos.

10. CONTROLE DE QUALIDADE DOS DADOS

No mês de dezembro de 2019, iniciaram-se as ligações para o controle de qualidade (CQ) das entrevistas realizadas com os membros na Coorte. Foram sorteados 10% da amostra estudada, totalizando 254 adolescentes e 252 mães ou responsáveis. O(A) adolescente sorteado era contatado por telefone e eram feitas dez perguntas, sendo nove

em relação ao questionário geral e uma para avaliação do atendimento na clínica (ANEXO 26). De maneira semelhante, a mãe ou responsável sorteado também era contatado por telefone e eram feitas outras dez perguntas, sendo nove em relação ao questionário geral e uma para avaliação do atendimento na clínica (ANEXO 27). O sorteio do CQ esteve sob responsabilidade da doutoranda Káren Sánches. As entrevistas foram realizadas por uma bolsista de apoio técnico (Ana Paula Maciel) diretamente no REDCap. O banco foi transferido para o programa estatístico Stata 16.0®, onde foram realizadas as análises de concordância.

11. REVERSÃO DE RECUSAS

Alguns adolescentes recusaram participar do acompanhamento no primeiro contato com a responsável pelos agendamentos na clínica, ou, ainda, aceitavam o agendamento várias vezes, mas não compareciam. Portanto, ao longo do acompanhamento, os responsáveis pelos agendamentos ligavam para os jovens e tentavam reverter tal situação, por meio de propostas como trocar horários ou então negociar sobre os procedimentos que despertavam medo ou desconfiança por parte dos(as) adolescentes. No entanto, em função da paralisação do campo devido a pandemia do novo Coronavírus, em 17 de março de 2020, esta etapa do trabalho de campo não chegou a ser concluída, pois pretendia-se, ainda, tentar reverter as recusas com auxílio dos doutorandos e supervisora do trabalho de campo.

12. HISTÓRICO DE COVID-19 NO BRASIL E NO MUNDO

Em março de 2020, a COVID-19, causada pelo novo coronavírus Sars-CoV-2 e relatada pela primeira vez em dezembro de 2019, como um surto de pneumonia de etiologia desconhecida, ocorrido em Wuhan, província de Hubei, China (Wuhan Municipal Health Commission, 2019), foi declarada uma pandemia global pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020), instanciando distanciamento físico e ordens de quarentena para mitigar sua rápida transmissão (Cookea et al., 2020). Neste sentido, as autoridades de saúde de muitos países ao redor do mundo passaram a impor medidas de distanciamento social, na tentativa de 'achatar a curva', reduzir o surto e não sobrecarregar os sistemas de saúde (Wu & McGoogan, 2020).

A COVID-19 tem sido considerada uma parente da síndrome respiratória aguda grave (SARS), que tem a possibilidade de transmissão de animais para humanos (Nature,

2020). Até o momento, a fonte do SARS-CoV-2 permanece desconhecida. No entanto, a infecção por SARS-CoV-2 foi associada ao contato com um vendedor local de frutos do mar em Wuhan, que vendeu ilegalmente alguns animais selvagens, incluindo morcegos (Wang et al., 2020a). O período médio de incubação da COVID-19 é estimado em 5,2 dias, com ampla variação entre os pacientes (Li, 2020), podendo ser passível de disseminação assintomática (Rothe, 2020; Ryu & Chun, 2020). Os sintomas de infecção incluem febre, calafrios, tosse, coriza, dor de garganta, dificuldade para respirar, mialgia, náusea, vômito e diarreia (Chen, 2020). Casos graves podem levar a lesão cardíaca, insuficiência respiratória, síndrome do desconforto respiratório agudo e morte (Holshue, 2020).

A epidemia de COVID-19 foi considerada uma ameaça global à saúde (Wang, 2020) e é de longe o maior surto de pneumonia atípica, desde o surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2003. Poucas semanas após o surto inicial, o número total de casos e mortes já havia excedido o da SARS (Hawryluck, 2004).

A seguir, a linha do tempo com as principais informações sobre COVID-19.

08 de dezembro 2019: Os primeiros casos de coronavírus foram registrados em um hospital de Wuhan, na China. As vítimas seriam frequentadores de um mercado atacadista de animais.

05 de janeiro 2020: É publicado o primeiro comunicado da Organização Mundial da Saúde a respeito do assunto. No documento, são relatados 44 casos de “pneumonia de causa desconhecida” em Wuhan/China.

09 de janeiro 2020: Divulgado o primeiro código genético do novo coronavírus.

09 de fevereiro 2020: Trinta e quatro brasileiros que viviam na cidade chinesa de Wuhan, epicentro do novo coronavírus, foram repatriados. Duas aeronaves da Força Aérea Brasileira aterrissaram no Brasil com o grupo, que ficou de quarentena por 14 dias, na Base Aérea de Anápolis, em Goiás.

26 de fevereiro 2020: Confirmado o primeiro caso de coronavírus no Brasil. O paciente era um homem de 61 anos, que havia viajado à Itália, e deu entrada no Hospital Albert Einstein, em São Paulo, no dia anterior.

05 de março 2020: Sobe para oito o número de casos confirmados do novo coronavírus no Brasil: seis em São Paulo, um no Espírito Santo e um no Rio de Janeiro. Também foi registrada a primeira transmissão interna no país.

09 de março 2020: O Ministério da Saúde anunciou a realização de teste para o coronavírus em todos os pacientes internados em hospitais públicos ou privados, com quadro respiratório grave, independentemente do histórico de viagem ao exterior.

10 de março de 2020: A Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, por meio do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (Cevs), confirmou o primeiro caso de infecção pelo novo coronavírus no Rio Grande do Sul. Tratava-se de um homem, de 60 anos, residente em Campo Bom, que teve histórico de viagem para Milão, na Itália, entre os dias 16 e 23 de fevereiro de 2020. O anúncio foi feito pelo governador Eduardo Leite, em coletiva à imprensa no Palácio Piratini.

11 de março 2020: A Organização Mundial da Saúde declarou a pandemia de coronavírus, estimando que o número de pessoas infectadas, mortes e países atingidos deveria aumentar nos dias e semanas seguintes.

13 de março 2020: O Ministério da Saúde regulamentou critérios de isolamento e quarentena, que deveriam ser aplicados pelas autoridades sanitárias em pacientes com suspeita ou confirmação de infecção por coronavírus. O primeiro paciente brasileiro diagnosticado com coronavírus foi curado. A Universidade Federal de Pelotas (UFPel), considerando as ponderações do Comitê Interno para Acompanhamento da Evolução da Pandemia por Coronavírus, formado por representantes do Hospital-Escola, das Faculdades de Medicina e Enfermagem, das pró-reitorias de Ensino, de Assuntos Estudantis e de Gestão de Pessoas e da Coordenação de Comunicação Social, em reunião realizada na manhã do dia 13 de março de 2020, decidiu suspender as atividades acadêmicas pelo período mínimo de três semanas, a partir do dia 16 de março de 2020. A medida adotada fazia parte de uma estratégia elaborada pela UFPel, com o intuito de minimizar a disseminação do Coronavírus e propiciar condições para que a Universidade pudesse se estruturar para o atendimento em saúde à comunidade.

16 de março 2020: Capitais do Rio de Janeiro e São Paulo já registravam transmissão comunitária (quando não é identificada origem da contaminação). Isso fez com que o país entrasse em nova fase da estratégia de contenção da COVID-19, que era criar condições de prevenção.

17 de março 2020: O Ministério da Saúde é notificado da primeira morte por coronavírus no Brasil. A vítima foi um homem de 62 anos, que tinha histórico de diabetes e hipertensão arterial, que estava internado na rede de hospitais Prevent Senior, em São Paulo e ainda não estava na estatística do governo. Considerando a orientação dada pela UFPel, de suspensão das atividades acadêmicas, e levando em consideração a segurança

e a saúde da equipe e dos participantes da Coorte e seus familiares, a coordenação da Coorte 2004 entendeu que seria necessário suspender o acompanhamento dos 15 anos.

20 de março 2020: O Ministério da Saúde declara reconhecimento de transmissão comunitária do novo coronavírus em todo o território nacional, apesar de nem todas as regiões apresentarem esse tipo de transmissão. A declaração dá ao Ministério da Saúde autoridade diante de todos os gestores nacionais, que devem adotar medidas que promovam distanciamento social e evitem aglomerações.

24 de março 2020: Foram registrados casos de Covid-19 nos 26 estados e no Distrito Federal.

25 de março de 2020: O primeiro caso do novo coronavírus foi registrado em Pelotas. A confirmação do Laboratório Central do Estado (Lacen/RS) foi anunciada pela prefeita Paula Mascarenhas, em coletiva de imprensa online. Tratava-se de uma mulher de 71 anos, que se encontrava em isolamento domiciliar, com bom estado de saúde, sem apresentar sintomas graves da doença. A senhora teve contato com um familiar que havia estado em Porto Alegre recentemente.

28 de março 2020: O avanço da Covid-19 no Brasil é considerado acelerado. Passaram-se 25 dias desde a confirmação do primeiro caso até que se chegasse à marca de mil casos; mas em apenas seis dias, foi alcançada a marca de 2 mil casos.

16 de abril 2020: Completado um mês desde a primeira morte pelo novo coronavírus no Brasil, o número de óbitos chegou a 1.952. O total de casos confirmados de Covid-19 em todo o Brasil era de 30.891.

21 de abril 2020: A taxa de mortalidade entre os casos diagnosticados de coronavírus no Brasil era de 6,3%. Todos os estados brasileiros registravam casos e mortes decorrentes da doença. São Paulo concentrava a maior parte das notificações: 15.383 casos e 1.093 óbitos.

29 de abril 2020: Em 24 horas, foram registradas 6.276 contaminações. No mesmo período, foram contabilizadas 449 mortes.

30 de abril 2020: Os dados colocavam o Brasil com mais casos confirmados do que a China, onde a epidemia começou. Outra marca: estudo do *Imperial College London* aponta que o país tem a maior taxa de contágio da Covid-19 em todo o mundo.

03 de maio 2020: Já passava de 100 mil o número de casos do novo coronavírus no Brasil, e de 7 mil o número de óbitos.

10 de junho 2020: Balanço do Ministério da Saúde registrava, pelo segundo dia consecutivo, alta superior a 32 mil novos casos do coronavírus.

Foram 32.913 diagnósticos em 24 horas, levando a 772.416 o total de casos da Covid-19. O número de óbitos registrados em um dia chegou a 1.274. Com a atualização, o total de mortes passou para 39.680. Os dados colocam o Brasil como líder na média diária de mortes, superando Estados Unidos e Reino Unido em total de óbitos.

27 de junho 2020: O Ministério da Saúde atualiza cronologia da COVID-19 no Brasil, ao afirmar que primeira morte pela doença aconteceu em 12 de março. Segundo a pasta, a primeira vítima no país foi uma mulher de 57 anos, que deu entrada no Hospital Municipal Dr. Carmino Caricchio, São Paulo, no dia 11 de março.

15 de dezembro 2020: A primeira quinzena de dezembro mostrou um aumento mais sustentado no número de mortes por COVID-19, tendo nas últimas 24 horas sido registrados 964 mortes. Logo no início do mês, finalmente o Governo Brasileiro apresentou o rascunho de um plano de vacinação. Este seria realizado em quatro etapas, que iriam variar de acordo com grupos prioritários. Na primeira fase, seriam prioridade para receber a vacina os profissionais da saúde, idosos com mais de 75 anos, ou com mais de 60 anos que vivessem em instituições de longa permanência, e a população indígena. Na segunda fase, idosos com idade entre 60 e 74 anos; na terceira fase, indivíduos com risco de doença grave, como portadores de doenças cardiovasculares ou renais; e, por fim, na quarta fase, os professores, profissionais da área de salvamento e força de segurança, funcionários do sistema prisional e população privada de liberdade.

30 de janeiro 2021: O início da segunda quinzena de janeiro foi marcado por uma decisão importantíssima para o país. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concedeu aprovação para uso emergencial de duas vacinas, a CoronaVac e a Vacina de Oxford. Um dia seguinte após a aprovação, que aconteceu no dia 17 de janeiro, aviões da força aérea brasileira decolavam para distribuir as vacinas pelo país e, na mesma semana, cada estado já iniciava a campanha de vacinação. Inicialmente, 6 milhões de doses da CoronaVac encontravam-se em solo brasileiro e mais 2 milhões de doses da Vacina de Oxford seriam trazidas da Índia. Estas eram doses importadas, mas tanto o Instituto Butantan, em São Paulo, como a FioCruz, no Rio de Janeiro, produzirão doses das vacinas que serão entregues ao Ministério da Saúde.

A previsão era de que a FioCruz produziria 100 milhões de doses da Vacina de Oxford até o final do primeiro semestre de 2021 e mais 100 milhões até o fim do ano. Já o Instituto Butantan pretendia produzir 86 milhões de doses da CoronaVac até o fim do ano. Havia ainda a possibilidade de o Brasil receber 42,5 milhões de doses de vacinas por fazer parte do Covax Facility, um consórcio liderado pela Organização Mundial de Saúde.

Nas últimas 24 horas foram registrados 58.462 novos casos e 1.194 óbitos de COVID-19. Uma nova variante do vírus SARS-CoV-2, identificada como P.1, inicialmente na cidade de Manaus, foi detectada pela primeira vez em outro estado brasileiro, em São Paulo.

19 de fevereiro 2021: O Brasil seguia em campanha de vacinação, sendo que 49,34% das doses recebidas pelos estados já haviam sido aplicadas, significando que 5.756.502 brasileiros já haviam recebido ao menos uma dose da vacina. A segunda dose da vacina havia sido aplicada a 1.051.406 brasileiros. O Ministério da Saúde negociou com produtores de vacina da Rússia e Índia, responsáveis pelas vacinas Sputnik V e Covaxin, respectivamente, para que as vacinas fossem disponibilizadas no Brasil.

09 de março 2021: Com o registro de 1.972 mortes, a data é a pior da pandemia, segundo dados divulgados pelo Conselho Nacional de Secretários da Saúde (Conass). Foram identificados também 70.764 novos casos da doença. O dia marca a pior semana do Brasil durante a pandemia do novo coronavírus.

23 de março 2021: O Brasil registrou novo recorde do número diário de mortes por COVID-19. Em 24 horas, foram registradas 3.251 mortes, segundo dados enviados pelos estados ao Ministério da Saúde e ao Conselho Nacional de Secretários de Saúde (Conass). Era a primeira vez que o país ultrapassava 3 mil óbitos causados pela doença, em apenas um dia desde o início da pandemia.

24 de março 2021: O Brasil atingiu o índice de mais de 300.000 mortes desde o começo da pandemia. Os casos confirmados de COVID-19 somavam 12.183.338. O Brasil é o país com o maior número diário de mortes por Covid-19 desde 5 de março. O país responde por 11% das mortes por Covid-19 de todos os países até agora, segundo dados da Universidade *Johns Hopkins*, EUA. Até então, o acompanhamento dos 15 anos da Coorte 2004 não teve suas atividades retomadas e o campo foi dado como concluído.

13. COORTE 2004 E A PANDEMIA DO NOVO CORONAVÍRUS

Após 18 semanas do início do trabalho de campo, tivemos que interromper o acompanhamento, frente à nova condição vivenciada e indicação de isolamento social, decorrente da pandemia do novo Coronavírus. Desta forma, dia 17 de março de 2020 foi o último dia de trabalho presencial da Coorte 2004. Nesta data, havíamos atingido o número de 1.949 díades mãe-adolescente entrevistados na clínica do CPE.

A partir de então, pensou-se em alternativas para continuar entrevistando os(as) participantes e suas mães ou responsáveis. Desta maneira, a secretária da Coorte 2004, de

forma remota, em *home-office*, seguiu fazendo atualização de cadastros e entrevistas via telefone. Nestas ligações, mãe e adolescente respondiam apenas seus respectivos questionários gerais. Ao total, no período de março a outubro e 2020, foram entrevistados 80 mães ou responsáveis e 64 adolescentes, conforme descreve a Tabela 3.

Tabela 3. Descrição do número de entrevistas via telefone, realizadas com a mãe ou responsável, a cada mês de 2020, durante a pandemia por COVID-19.

Mês	Número de entrevistas
Março	1
Abril	6
Maio	19
Junho	18
Julho	10
Agosto	5
Setembro	12
Outubro	9
Total	80

14. OUTRAS CIDADES

Alguns(mas) adolescentes, aos 15-16 anos, estavam residindo fora da cidade de Pelotas. Para esses(as) adolescentes, era feita a proposta de agendarem a visita à clínica durante alguma vinda à Pelotas, como no período de férias escolares ou em feriados, tendo em vista que, para este acompanhamento, não se teve verba para ressarcir possíveis gastos com passagens. Desta forma, tentava-se conciliar a visita à clínica com a vinda à Pelotas.

Dentre os participantes avaliados neste acompanhamento, 268 moravam fora do município de Pelotas. Dessa forma, foi realizado contato telefônico com estes jovens e seus responsáveis, sendo que 1.937 compareceram à clínica para acompanhamento e 79 responderam ao questionário por telefone (no período após o início da pandemia do novo Coronavírus). A Tabela 4 especifica o número de adolescentes residentes em Pelotas, em outra cidade do RS, Santa Catarina e em outro estado, e as entrevistas realizadas na clínica ou por telefone.

Tabela 4. Entrevistas realizadas na clínica e por telefone com adolescentes residentes em Pelotas, outra cidade do RS, Santa Catarina e em outro estado (N=2.016).

Local	Adolescentes	Entrevista	
		Clínica	Telefone
Pelotas	1.748	1.748	0
Rio Grande do Sul	218	175	43
Santa Catarina	35	11	24
Outro estado	15	3	12
Total	2.016*	1.937	79

*Sem dados de cidade/estado de residência: 13.

15. GERENCIAMENTO DOS DADOS

11.1 REDCap

Todos os computadores utilizados para a coleta de dados estavam vinculados ao servidor do REDCap no CPE, onde os instrumentos para coleta de dados foram desenvolvidos. Um ícone para acesso rápido ao ambiente de coleta foi configurado na área de trabalho de cada computador. O acesso ao ambiente de coleta era exclusivamente feito a partir da rede local (dentro das dependências da clínica), visto que o servidor central foi configurado somente para este fim. Cada membro da equipe necessitava de um identificador e uma senha para ingressar no ambiente virtual. Além disso, cada membro da equipe tinha acesso somente ao seu setor, não sendo possível adentrar outra estação equivocadamente.

Os dados coletados na clínica eram registrados em tempo real no servidor central do REDCap, para evitar que possíveis falhas do sistema acarretassem em perda de dados. O processo de extração de dados do servidor e a tradução destes dados para bancos Stata® eram feitos semanalmente.

11.2 Equipamentos

✓ *BodPod*

Os dados eram armazenados no banco de dados do aparelho e extraídos semanalmente, em formato de texto, com os dados das variáveis separados por tabulações.

Era gerado um banco em Stata®, através do comando “infix”, e rodado um *script* para renomear, organizar e criar rótulos para as variáveis, separando as observações por indivíduo.

✓ **DXA**

Os dados coletados durante o exame foram armazenados em tabelas do Microsoft Access®, através de uma consulta, que gerou uma nova tabela, contendo os dados do(a) adolescente (nquest, nome, idade, etc.) e os resultados de sua composição corporal (densidade óssea, massa magra e massa gorda). Foram gerados dois bancos de dados, utilizando-se o StatTransfer®: composição corporal e densidade óssea. Após, foi rodado um *script* em cada banco para renomear, criar rótulos para as variáveis e organizar as observações por adolescente.

11.3 Análise de inconsistências

A cada semana, era realizada uma análise das inconsistências do banco de dados pelo doutorando Pedro Augusto Crespo da Silva, por meio de um *dofile*, quando era conferida a coerência das respostas. Semanalmente, a doutoranda Riceli Rodeghiero analisava as inconsistências diretamente via ferramenta do REDCap, com foco principal em valores aberrantes da antropometria, pressão arterial e BodPod. Uma planilha com as inconsistências detectadas era repassada as entrevistadoras, para que cada situação fosse corrigida.

16. EQUIPE

A coordenação do Estudo de Coorte de Nascimentos de 2004 em Pelotas é dos professores Iná Santos, Alicia Matijasevich e Aluísio Barros. A área de Saúde Mental foi coordenada pelos Professores Alicia Matijasevich e Tiago Neuenfeld Munhoz. A coordenação geral do acompanhamento foi realizada pela Professora Luciana Tovo Rodrigues e a supervisão da clínica, pela pós-doutoranda Isabel Oliveira Bierhals. As pós-doutorandas Bianca Del Ponte da Silva, Bruna Schneider e Gabriela Callo, bem como os Professores Renata Moraes Bielemann e Inácio Crochemore Mohnsam da Silva também apoiaram todo o trabalho de campo. Este acompanhamento também contou com a colaboração integral dos doutorandos Káren Sanches, Pedro Augusto Crespo da Silva e Riceli Rodeghiero, que, por meio de uma escala de revezamento, realizavam plantões

diários. Ainda, o trabalho de campo teve a participação da aluna de doutorado Francine Santos e de duas alunas da Universidade de São Paulo, sendo elas Jessica Mayumi Maruyama e Ana Beatriz Bozzini. A equipe de trabalho da clínica foi composta por 49 pessoas, distribuídas em diferentes cargos e em dois turnos, conforme demonstra a Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição da equipe conforme a função.

Função	Número de pessoas
Recepção	4
Fluxo frente	2
Fluxo fundo	2
Entrevistadoras	10
Psicólogo(a)	10*
Monitora do QFA	2
Antropometria	4
BodPod	2
DXA	2
Acelerometria	2
Atualização de cadastro e agendamento	4 [‡]
Secretária	1
Total	49

*De janeiro a março de 2020 foram contratados mais dois psicólogos, para auxiliar a atender a demanda da clínica.

‡Foram contratadas mais duas pessoas para auxiliar na atualização de cadastro e agendamento dos participantes, uma inicialmente contratada em novembro de 2019 e a outra, em fevereiro de 2020.

14.1 Reuniões de trabalho

14.1.1 Pesquisadores, supervisão e colaboradores

A equipe de professores pesquisadores, coordenadora, supervisora, colaboradores e doutorandos tinham reuniões mensais para a discussão de estratégias de logística e busca dos(as) adolescentes, distribuição de tarefas e responsabilidades e atualização do trabalho de campo.

14.1.2 Equipe

Ao longo do trabalho de campo, foram realizadas reuniões com a equipe de campo, com o objetivo de informar eventuais mudanças na logística, questionários, postura e etc. As reuniões eram organizadas pela supervisora do trabalho de campo (Isabel Oliveira Bierhals), em conjunto com a secretária da Coorte (Deise Modesto).

14.2 Alterações na equipe no decorrer do trabalho de campo

No decorrer do trabalho de campo, alguns bolsistas solicitaram o desligamento, sendo necessárias novas contratações para substituí-los. Foram três desligamentos de psicólogos no primeiro mês do trabalho de campo. Por este motivo, no início de janeiro de 2020, realizamos outro treinamento de Saúde Mental, com todos os suplentes que não haviam sido selecionados pelo edital da Fundação Delfim Mendes Silveira, sendo os primeiros três melhores classificados contratados para substituir os desligamentos de dezembro. Neste mesmo treinamento, selecionamos mais dois psicólogos com verba de outro projeto de pesquisa, para agilizar o fluxo na clínica. Em janeiro, houve mais dois desligamentos e substituições, uma bolsista psicóloga e outra bolsista que atuava no QFA. Em fevereiro, cinco bolsistas solicitaram desligamentos (duas psicólogas, duas entrevistadoras e um bolsista responsável pelo fluxo na clínica). Foi necessário realizar contratações para substituí-los, pois a demanda do campo ainda era alta.

17. ASPECTOS FINANCEIROS

O controle financeiro da pesquisa ficou a cargo da coordenadora Luciana Tovo Rodrigues, com colaboração da secretária Deise Modesto. O presente trabalho de campo contou com fonte de verba de três projetos de pesquisa. Os recursos provenientes do Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) era administrado pela Fundação Delfim Mendes Silveira, enquanto que as verbas provenientes de projetos dos Professores Cesar Victora e Alicia Matijasevich eram administradas pelo financeiro do CPE. Um detalhamento maior deste item poderá ser encontrado no Relatório Financeiro de Trabalho de Campo.

18. QUESTÕES ÉTICAS

O acompanhamento dos 15-16 anos da Coorte de 2004 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Pelotas por meio do número e parecer 3.554.667 (CAAE: 20183419.1.0000.5317) (ANEXO 28). Todos os participantes assinaram o TCLE e tiveram a garantia de sigilo das informações fornecidas. Mães ou responsáveis em risco de suicídio recebiam orientações gerais dos psicólogos e eram orientados a procurar serviço de atendimento médico, assim como quando a mãe relatava risco de suicídio do(a) adolescente. Uma lista dos serviços de saúde disponíveis na cidade era entregue aos responsáveis (ANEXO 29).

19. RESULTADOS PRELIMINARES DO TRABALHO DE CAMPO

A seguir são apresentados alguns dos principais resultados do trabalho de campo.

Como panorama geral do acompanhamento, observa-se, conforme Figura 5, nas semanas 1 a 3, um número menor de jovens sendo acompanhados, devido ao agendamento ter sido programado para tal. Eram as semanas de adaptação dos entrevistadores e psicólogos e a logística ainda estava sendo testada. A partir da semana 4, houve um aumento importante no número de atendimentos. Observa-se um declínio nas semanas seguintes, devido às festas do final do ano de 2019. Após, houve um aumento substancial no número de acompanhados, atingindo seu ápice na semana 12, com um total de 161 entrevistadas. O trabalho de campo teve duração de 18 semanas, tendo sido interrompida no dia 17 de março de 2020, devido a pandemia do novo Coronavírus. Nesta semana, composta por apenas dois dias, foram acompanhados 46 adolescentes.

Das 4.231 crianças nascidas vivas em 2004, 102 foram detectadas como óbitos (até o ano de 2020). Dentre os 4.129 restantes, 1.949 realizaram as entrevistas na clínica (entre 2019 e 2020) e 80 via telefone (em 2020, no período de pandemia). Dessa forma, os indivíduos que completaram as entrevistas, somados aos óbitos, resultaram em uma taxa de acompanhamento de 50,4%.

Em 2022, quando a pandemia estava controlada, e após a finalização do estudo do impacto COVID-19, realizado com os adolescentes acompanhados aos 15 anos quando completaram 17 anos, decidiu-se não incluir no acompanhamento dos 15 anos os dados coletados por telefone. Essa decisão foi tomada em virtude de os dados terem sido coletados durante a pandemia, o que poderia diferenciar esse grupo do grupo entrevistado

pré-pandemia. Assim, o N final do acompanhamento dos 15 anos foi 1949 e a taxa de acompanhamento foi 48,5%.

***II. RELATÓRIO FINANCEIRO DE
TRABALHO DE CAMPO***

O estudo da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas teve início no dia 20 de novembro de 2019. No entanto, as estimativas com os gastos relacionados ao trabalho de campo já estavam sendo previstas e organizadas nos três meses anteriores. Os recursos destinados para os nove meses de campo foram de financiamentos de projetos, por meio de órgãos de pesquisas: Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO).

O financiamento pela verba do DECIT foi administrado pela Fundação Delfim Mendes da Silveira, de acordo com as demandas de gastos, que seriam necessárias para os nove meses de campo. Foi elaborada uma planilha com as estimativas do que seria necessário para dar início e continuidade às atividades.

Estabelecemos os gastos com a equipe de auxiliares de pesquisa, que seria responsável pela atualização de cadastro e posterior agendamento dos participantes e seus responsáveis e pelo processo de secretariado da coorte, totalizando quatro bolsistas. Também foram contabilizados os gastos com o pessoal que atuaria na coleta direta de dados com os participantes (totalizando 39 bolsistas, que atuariam em diferentes funções). Além da equipe de trabalho, o estudo também contou com duas bolsistas de pós-doutorado, que ficaram responsáveis pela escrita de artigos, administração do banco de dados da coorte e supervisão do trabalho de campo.

Foram ainda previstos gastos com uma pessoa, que faria os rastreamentos, ou seja, a procura direta dos endereços dos participantes não encontrados via telefone ou rede social; e outra pessoa, que seria responsável pelo recolhimento dos acelerômetros nas residências dos participantes.

Por esta mesma verba, foram estimados ainda gastos com gêneros de alimentação e lanches aos participantes, materiais de expediente, materiais de higiene e limpeza, serviço de lavanderia, impressões de materiais para divulgação, reprodução de documentos, brinde aos participantes, taxas de importação e materiais que seriam utilizados no campo pelos participantes, como pulseiras e crachás. Soma-se ainda a este recurso a ajuda de custo fornecida a cada participante, como auxílio de deslocamento, custos com treinamentos da equipe e testes específicos de saúde mental, que foram adquiridos diretamente de sites e plataformas.

Conforme citado anteriormente, a Coorte 2004 recebeu apoio financeiro da ABRASCO. Por esta verba, foram planejados alguns gastos que não haviam sido previstos no orçamento do DECIT. Dentre eles temos a contratação de uma pessoa para

limpeza da clínica depois das 16hs e aos sábados; manutenção do aparelho BodPod e do DXA; compra de um dos testes de Saúde Mental; pagamento das mães de participantes com deficiência intelectual, que precisaram retornar à clínica; e produtos e materiais, que foram necessários no decorrer do campo.

Foi possível também o apoio financeiro por um projeto do CNPq da Professora e coordenadora da Coorte 2004, Alicia Matijasevich Manitto. Este projeto deu suporte para que fossem contratados bolsistas, que não estavam previstos no projeto inicial. Incluem-se neste grupo dois psicólogos extras, duas pessoas para auxiliar no agendamento e dois supervisores para os testes de Saúde Mental.

Nota: Anexos disponíveis no link: http://www.epidemioufpel.org.br/site/content/coorte_2004/questionarios.php

REFERÊNCIAS

Chen, N. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *Lancet*, 395, 507–513, 2020.

Cookea, JE; Eiricha, R; Racinea, N; Madigana, S. Prevalence of posttraumatic and general psychological stress during COVID-19: A rapid review and meta-analysis. *Psychiatry Research*, 292,113347, 2020.

Harris, PA; Taylor, R; Thielke, R; Payne, J; Gonzalez, N; Conde, JG. Research Electronic Data Capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.*, v. 42, n. 2, p. 377–381, 2009.

Hawryluck, L. SARS control and psychological effects of quarantine, Toronto, Canada. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1206–1212, 2004.

Holshue, ML; DeBolt, C; Lindquist, S; Lofy, KH; Wiesman, J; Bruce, H; Spitters, C; Ericson, K; Wilkerson, S; Tural, A; Diaz, G; Cohn, A. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 382:929-936, 2020.

Li, Q. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 382:1199-1207, 2020.

Nature. Stop the Wuhan virus. *Nature* 2020, 577, 450.

Rothe, C. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *N. Engl. J. Med.*, 382:970-971, 2020.

Ryu, S; Chun, BC; Korean Society of Epidemiology 2019-nCoV Task Force Team. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus. *Epidemiol. Health*, 42, e2020006, 2020.

Sakib, N; Bhuiyan, AKMI; Hossain, S; Al Mamun, F; Hosen, I; Mamun, MA. Psychometric validation of the Bangla Fear of COVID-19 Scale: confirmatory factor analysis and rasch analysis. *Int. J. Ment. Health Addiction*, 11, 1-12, 2020.

Santos, IS; Barros, AJD; Matijasevich, A; Domingues, MR; Barros, FC; Victora, CG. Cohort Profile: The 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology*, v. 40, p. 1461–1468, 2011.

Santos, IS; Barros, AJD; Matijasevich, A; Zanini, R; Cesar, MAC; Camargo-Figuera, FA; Oliveira, IO; Barros, FC; Victora, CG. Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International Journal of Epidemiology*, v. 43, n. 5, p.1437–1437f, 2014.

Wang, C. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*, 395, 470–473, 2020.

Wang, W; Tang, J; Wei, F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-ncov) in Wuhan, China. *J. Med. Virol.*, 92:441–447, 2020a.

Wang, Y; Di, Y; Ye, J; Wei, W. Study on the public psychological states and its related factors during the outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in some regions of China. *Psychol. Health Med.*, 26(1):13-22, 2021.

Wilder-Smith, A; Chiew, CJ; Lee, VJ. Can we contain the covid-19 outbreak with the same measures as for SARS? *Lancet Infect. Dis.*, 20(5), E102-E107, 2020.

WHO, World Health Organization, 2020a. Coronavirus Disease (COVID-19): Situation Report – 124. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200523-covid-19-sitrep-124.pdf?sfvrsn%49626d639_2.

Wu, Z; McGoogan, JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from

the Chinese Center for Disease Control and Prevention. Journal of the American Medical Association, 323(13), 1239-1242, 2020.

Wuhan Municipal Health Commission. Wuhan Municipal Health Commission's Briefing on the Pneumonia Epidemic Situation. 2019. Disponível em: <http://wjw.wuhan.gov.cn/>

PARTICIPAÇÃO DA DOUTORANDA NO TRABALHO DE CAMPO:

Atividades desenvolvidas (15 anos coorte 2004):

- Treinamento, re-treinamento teórico e prático das antropometristas na coleta de cabelo e padronização de medidas de coletas de cabelo;
- Edição do manual de coleta de cabelo.
- Supervisão de todas as atividades relativas ao trabalho de campo na clínica;
- Atualização diária do número total de participantes acompanhados, perdas e recusas;
- Controle do número de exames pendentes em cada participante da coorte;
- Análise de consistência dos dados, durante o campo e pós-campo;
- Sorteio do número de participantes para fazer o controle de qualidade;
- Participação na elaboração do Relatório final de Trabalho de Campo.

Atividades desenvolvidas (COVID coorte 2004):

- Treinamento teórico e prático das antropometristas na coleta de cabelo e padronização de medidas de coletas de cabelo;
- Edição e adequação do manual de coleta de cabelo, para coletas domiciliar.

Atividades desenvolvidas (18anos coorte 2004):

- Supervisão de todas as atividades relativas ao trabalho de campo na clínica, diariamente, nos meses de agosto a dezembro do ano 2022.

Artigo 1

Publicado na revista Mutation Research/Reviews in Mutation Research

doi:10.1016/j.mrrev.2022.108428.

The contribution of whole-exome sequencing to intellectual disability diagnosis and knowledge of underlying molecular mechanisms: a systematic review and meta-analysis.

Karen Y. Sánchez-Luquez, Marina Xavier Carpena, Simone M. Karam, Luciana Tovo-Rodrigues

Karen Yumaira Sánchez-Luquez PhD, Postgraduate Program in Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil. ksanchezluquez@gmail.com
Marina Xavier Carpena PhD, Postgraduate Program in Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil. marinacarpa_@hotmail.com.

Simone M. Karam PhD, Postgraduate Program in Public Health, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil. karam.simone@gmail.com

Luciana Tovo-Rodrigues PhD, Postgraduate Program in Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil. luciana.tovo@gmail.com

Corresponding author: Luciana Tovo-Rodrigues – Post-graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil, Mal. Deodoro Street 1160, 2th floor, Pelotas-RS, Brazil; ZIP code 96020-220 Tel./Fax: +55 53 32841300, e-mail: luciana.tovo@gmail.com

ABSTRACT

Whole-exome sequencing (WES) is useful for molecular diagnosis, family genetic counseling, and prognosis of intellectual disability (ID). However, ID molecular diagnosis ascertainment based on WES is highly dependent on de novo mutations (DNMs) and variants of uncertain significance (VUS). The quantification of DNM frequency in ID molecular diagnosis ascertainment and the biological mechanisms common to genes with VUS may provide objective information about WES use in ID diagnosis and etiology. We aimed to investigate and estimate the rate of ID molecular diagnostic assessment by WES, quantify the contribution of DNMs to this rate, and biologically and functionally characterize the genes whose mutations were identified through WES. A PubMed/Medline, Web of Science, Scopus, Science Direct, BIREME, and PsycINFO systematic review and meta-analysis was performed, including studies published between 2010 and 2022. Thirty-seven articles with data on ID molecular diagnostic yield using the WES approach were included in the review.

WES testing accounted for an overall diagnostic rate of 42% (Confidence interval (CI): 35–50%), while the estimate restricted to DNMs was 11% (CI: 6–18%). Genetic information on mutations and genes was extracted and split into two groups: (1) genes whose mutation was used for positive molecular diagnosis, and (2) genes whose mutation led to uncertain molecular diagnosis. After functional enrichment analysis, in addition to their expected roles in neurodevelopment, genes from the first group were enriched in epigenetic regulatory mechanisms, immune system regulation, and circadian rhythm control. Genes from uncertain diagnosis cases were enriched in the renin-angiotensin pathway. Taken together, our results support WES as an important approach to the molecular diagnosis of ID. The results also indicated relevant pathways that may underlie the pathogenesis of ID with the renin-angiotensin pathway being suggested to be a potential pathway underlying the pathogenesis of ID.

Keywords: ID diagnostic yield; ID reverse phenotype; ID epigenetic regulation; ID immune activation; ID circadian rhythm control.

¹ **Abbreviations:** WES: Whole-exome sequencing; ID: intellectual disability; DNMs: de novo mutations; VUS: variants of uncertain significance; NGS: next-generation sequencing; IEM: inborn errors of metabolism; ASD: autism spectrum disorder; NDD: Neurodevelopmental Disorders; QUADAS-2: Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2; CNV: copy number variation; CNVs: copy number variations; HPO: human phenotype ontology; CMA: chromosomal microarray; MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification; qPCR: quantitative PCR; CNV-seq: CNV-sequencing; HK1: Hexokinase 1; RAS: renin-angiotensin systems; GATK: Genome Analysis Toolkit

1. INTRODUCTION

Intellectual disability (ID) is a developmental disorder characterized by impairments in intellectual function and adaptive behavior that occurs before 18 years of age [1]. It is a condition with medical, educational, and social impacts [2] affecting approximately 2–3% of the global population [3]. A varying proportion of ID cases (ranging from 17 to 50%) are attributable to genetic causes [4,5]. Different next-generation sequencing (NGS) methods [6] have improved the process of diagnosing ID when compared with traditional tests, such as karyotyping, FISH, DNA microarray, testing of specific genes, and inborn errors of metabolism (IEM) [1]. Whole-exome sequencing (WES), despite being

restricted to evaluation of exons only, and to tag the vast majority of the exome (generally 95 -98% of exome is sequenced) is useful in these cases, as approximately 85% of pathogenic mutations are located in exons [7]. WES is considered a powerful approach for the genetic evaluation of phenotypically heterogeneous and monogenic conditions, such as ID, and represents an accurate diagnostic procedure to be implemented in cases without a conclusive diagnosis. [8–10]. It is estimated that approximately 25% of ID cases with WES recommendations achieve a positive molecular diagnosis [11–14]. However, the diagnostic rate can vary from 9.43 to 100% [15,16], leading to a wide range of cases that remain unsolved. Understanding the possible factors associated with the wide variation in diagnostic rate might benefit clinical research on ID and provide further information on ID etiology. Therefore, the usefulness of WES continues to be a focus of discussion in clinical research.

High variability in diagnostic estimates could be indicative of major challenges, such as methodological difficulties in detecting *de novo* mutations (DNMs) and poor knowledge about the clinical impact of variants, such as the detection of variants with uncertain clinical significance (VUS). WES is a widely used approach to detect DNMs, and its relevance for ID positive diagnosis has been reported [17–22]. However, the estimated proportion of positive ID molecular diagnoses that are attributable to DNMs, as well as the factors associated with the detection of DNMs (i.e., study design), have not been explored so far.

Detection of VUS, another important cause of unsuccessful molecular diagnosis using WES, is commonly observed. Unsolved cases comprise situations in which clinical synopsis associated to the identified variant/gene is not consistent with the patient's phenotype, mainly owing to a lack of evidence in favor of its clinical relevance based on available evidence [23]. The rate of VUS identified through WES for neurology practice reported thus far varies from 25.3 to 86% [10,24]. The WES approach has provided a great number of potential genes involved in ID etiology, whose compilation could be important in summarizing the functional information about them. Understanding the biological pathways and mechanisms impaired by the mutations detected in cases of ID positive molecular diagnosis and those identified in subjects with inconclusive diagnosis, such as VUS, may allow us to broaden the knowledge of their relevance in the pathogenesis of disease and, therefore, to better understand their clinical significance.

Few systematic reviews focusing on the use of WES for molecular diagnosis of ID have been published thus far (Table S1). The reviews, including narrative ones, show a notable disparity in terms of the inclusion criteria. They are sometimes too strict, including cases of specific patterns of ID inheritance or a specific phenotype regarding ID severity [25]. In contrast, they may also be too broad, encompassing several neurodevelopmental outcomes [26–28], such as epilepsy, autism spectrum disorder (ASD), other neurodevelopmental disorders (NDDs), or NDD plus associated conditions [29,30]. The variability in terms of the genomic regions assessed is also noteworthy. Current reviews comprise reports providing the results of WES [31,32], as well as other approaches, such as targeted gene panel sequencing [33] and whole-genome sequencing [32]. Therefore, a reliable estimate of ID molecular diagnosis yield through WES is absent in the current literature. Notably, none of the reviews published so far have aimed to systematically characterize the biological mechanisms present in the relevant genes reported to date.

In this study, we performed a systematic review of the literature concerning the use of WES for molecular diagnosis of ID to address the above-mentioned gaps in the literature. This study aims to (i) estimate the ID molecular diagnostic yield through meta-analysis, (ii) quantify the contribution of DNMs in ID molecular diagnostic yield, (iii) explore the role of study design in each of the molecular diagnosis estimates, and (iv) characterize, in terms of biological functions and mechanisms, the set of genes whose mutation was used to ascertain the ID molecular diagnosis and the set of genes whose mutations did not allow for the molecular diagnosis, such as VUS or nonpathogenic mutations.

2. METHODS

This study was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) under the protocol number CRD42021236178. This systematic review was conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [34].

A structured search was performed using six databases (PubMed/Medline, Web of Science, Scopus, Science Direct, BIREME, and PsycINFO) until February 28, 2022. Relevant MeSH terms were comprised of the following key words: ("intellectual disability" OR "mental retardation" OR "mental deficiency" OR

"developmental disorders" OR "neurogenetic disorders" OR "monogenic disorder") AND (whole exome sequencing OR "high-throughput DNA sequencing" OR "massively parallel sequencing" OR "exomes" OR "exome sequencing" OR "whole-exome sequencing") AND ("genetics") NOT ("syndrome" OR "case reports" OR "case report"). All retrieved records were uploaded into the referencing software Zotero [35] to build a virtual library. Duplicate records were excluded from this software using DOI numbers and the authorship of the articles. Articles aimed at evaluating or describing the genetic causes of ID in children or adults were included. All studies were conducted on humans without restrictions on their study design or publication period. The exclusion criteria were as follows: articles referring to major forms of developmental delay as the main issue, studies referring to specific syndromes, candidate gene studies, and *in silico* studies. Letters to the editor, comments, conference abstracts, case reports, case series, and articles with a sample size of less than ten people were also excluded. Two independent reviewers (KS and MC) read all titles, abstracts, and full texts, and evaluated the papers included in the review. In case of disagreement, the reviewers attempted to reach a consensus. Persistent disagreements were resolved by a third reviewer (LT-R) who made the final decision.

After full-text reading, the following information was extracted: authors, year, country, study design, sample size, age range, sex composition, IQ measurement method, WES, and variant calling methodologies. For articles with missing information, inconsistencies, or unavailable data, the missing data were requested by e-mail. A second reminder e-mail was sent after three weeks. If it was not possible to verify the information, the data were excluded from the review. Among the selected articles, overlapping results (i.e., duplicate reports of individuals) were detected between two articles: de Ligt (2012) and Willence (2013) [36,37]. In this case, the results reported in the original article were retained for both review and meta-analysis. Citations in the included papers were also searched to avoid missing studies.

Articles included were divided into four categories according the "unit of analysis design": (1) cohort (or singleton), which included unrelated individuals based on common phenotypic characteristics; (2) trio, in which ID sporadic patients and both biological parents had the exome sequenced; (3) familial, genotyping of

multiple individuals with ID in the same family; and (4) reanalysis, comprising studies of reanalysis of a dataset. The last category mainly included cohort or trio studies with persistently negative or uncertain diagnosis results for WES after the first data evaluation. In this case, the raw sequencing data were reanalyzed using a new analytical pipeline or reinterpretation of all confirmed variants. The classification was performed based on the authors' report in the paper or according to the most representative category in the diagnostic rate calculation. For example, McSherry et al. (2018) which included families (more than one affected child and its parents) and a greater proportion of trio cases (one affected child and its parents), was considered for the present study as a trio sequencing approach.

Article quality was assessed using a modified Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2) [38] (details in the Supplementary Methodology). QUADAS-2 is a tool which evaluates a diagnostic study's quality, examining "risk of bias" and "concerns regarding applicability" separately. Items were evaluated for risk of bias according to four domains: patient selection (description of methods used for patient selection), index test (description of the index test [WES] and how it was conducted and interpreted), reference standard (description of standard reference [clinical diagnoses] and how it was conducted and interpreted), and flow and timing (description of the interval and any interventions between index tests and the reference standard). Applicability of the studies was evaluated for the first three key domains in each study: (1) Are there concerns that the included patients do not match the review question? (2) Are there concerns that the index test, its conduct, or its interpretation differs from the review question? (3) Are there concerns that the target condition defined by the reference standard does not match the review question? Each domain was classified as low risk of bias, high risk of bias, or "unclear," indicating a lack of sufficient information. Two reviewers (KS and MC) independently coded the domains, and a third reviewer (LT-R) resolved any disagreement.

2.1. Diagnosis rate meta-analysis

The molecular diagnostic rate was retrieved from each study according to the authors' report or was recalculated based on the inclusion criteria of this review. It comprises mutations classified or interpreted as pathogenic or likely pathogenic, which explains the patient's phenotype. For recalculation, we used

the data reported by the authors to establish the molecular diagnosis rate of ID. Only variants reported in unrelated probands were considered (in the case of affected siblings, only one was considered in the calculation).

A random-effects meta-regression to determine molecular diagnostic yield of the full sample, and samples grouped by category (by “unit of analysis design”) was run in R (version 4.0.3) “meta” package [39]. The diagnosis rate was analyzed using generalized linear mixed models (GLMM; recommended for meta-analysis of single proportions) weighted by the number of cases in each study. The 95% confidence intervals (CIs) were calculated for each study using the exact binomial interval (Clopper–Pearson interval [default]). The pooled results are summarized as forest plots. Statistical significance was set at $P < 0.05$ (2-sided). Two meta-analyses including different data were performed: one aimed to assess the overall molecular diagnostic performance via WES (n positive patients/ n total patients), and the other to assess the diagnostic proportion due to DNMs on the entire sample (n positive due to DNMs patients/ n total patients). In both cases, point mutations, indels, and copy number variation (CNV) were considered within the positive diagnostic rate. For each meta-analysis, the data from the original articles were stratified by a “unit of analysis design” category.

The magnitude of the between-study heterogeneity was quantified using the I^2 statistic. A priori, we decided to report the pooled, weighted estimate generated by random-effects models to account for a potentially high degree of between-study heterogeneity. Plots were created using the “meta” and “ggplot2” packages in R [40]. Publication bias results are shown as a funnel plot. Funnel plot symmetry was assessed using Peter’s and Egger’s tests and was run in the R (version 4.0.3) “meta” package [39].

The relationship between the ID molecular diagnosis rate and the evolution of NGS technology was also assessed. For this, a chart plotting ID molecular diagnostic rates according to the date of publication of the study was created. Plots were created using the “meta” and “ggplot2” packages in R [40].

2.2. Gene dataset and functional analysis

For the included papers, all reported genes whose variants were identified through WES were extracted and classified into two groups according to whether their mutations were sufficient to provide the ID molecular diagnosis. The first group comprised all genes with variants used to confirm the diagnosis (“ID

Molecular Diagnosis gene set”), as reported in the original articles. The second comprised genes reported in ID individuals with inconclusive molecular diagnosis (“Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set”). Most genes in this set had a VUS. Copy number variations (CNVs) that encompassed several genes (e.g., 12p13.33 del) were excluded from this analysis to avoid introducing bias into the gene set composition. To avoid bias in data interpretation, for genes overlapping both gene sets, we used a priori criteria to keep them only in the “ID Molecular Diagnosis gene set.” Those genes were initially not associated with ID or associated phenotypes and were subsequently considered or classified as genes for ID after well-established functional and/or clinical evidence. Therefore, the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set” contained unique genes after eliminating the genes that it had in common with the “ID Molecular Diagnosis gene set.”

The GeneBank gene identifier number was obtained to verify both “symbol gene” and alternative names (“Aliases name”), using the R “clusterProfiler” package [41] to ensure the updated “symbol/name” identification of the genes and to eliminate replicates.

To characterize both sets in terms of putative biological mechanisms common to the genes included in each group, we conducted a functional enrichment analysis for each gene set using the FUMA 1.3.6 [42] online tool (available at <http://fuma.ctglab.nl>). To test for overrepresentation of biological functions, both lists of genes were tested independently against gene sets obtained from MsigDB (Gene Ontology biological processes (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), miRNA targets, and positional gene set) using hypergeometric tests. This type of analysis [43] is a common secondary analysis of the collection of genes, owing to its ability to provide valuable insight into the collective biological function underlying a list of genes [44]. By systematically mapping genes and proteins to their associated biological annotations (such as GO terms [45] or pathway membership), enrichment analysis can identify terms that are statistically over-represented or under-represented within the list of interest [46]. In this study, this analysis was used to explore potential biological mechanisms enriched in the “ID Molecular Diagnosis gene set” and “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set”. The coding genes (number of background genes = 20,260) in the genome were used as the background set. Multiple testing correction (i.e.,

Benjamini-Hochberg) was performed for each data source for the tested gene sets. FUMA reported gene sets with an adjusted P-value of ≤ 0.05 . A minimum of five genes were included in each function. For a less strict secondary analysis, we also performed a new test using the whole genome as reference (number of background genes = 57,241).

3. RESULTS

3.1. Selection of studies

The search returned 2,256 articles, 833 of which were duplicates. After reading the titles and abstracts, 128 articles were selected for full-text review. Of these, 91 articles were excluded for the following reasons: 65.9% (n = 60) considered major forms of developmental delay as an outcome or referred to specific syndromes; 9.9% (n = 9) were based on the candidate-gene approach or were *in silico* studies; 5.5% (n = 5) were related to the development of a new strategy for variant calling; and 18.7% (n = 17) covered several disorders; therefore, it was not possible to extract the specific data for ID. A PRISMA flowchart is presented in Figure 1. Thirty-seven studies were included in the present review. Table 1 summarizes the characteristics of the studies included in the review and Table 2 lists the relevant characteristics of each study.

3.2. Study characteristics

The sample sizes ranged from 10 to 318 individuals, with a median of 61 (n total individuals = 2,252) (Tables 1 and 2). The majority of samples were from Europe (Netherlands) and Asia (Iran, Pakistan, Saudi Arabia, Oman, Turkey, Syria, China). Considering the study design classification, the most frequent was trio (59.45%), followed by family (24.32%) and cohort (10.81%). Only two studies have estimated the yield based on the reanalysis of ID case exome data [47,48]. In these studies, data from patients for whom ID molecular diagnosis was not possible in the first analysis were reanalyzed. Both studies reported positive molecular diagnosis cases of ID. This included raw WES data, clinical information, and/or data re-annotation.

All articles included both sexes, except for two studies that exclusively included women [16,49]. However, information regarding the total sex sample composition

was not presented in most studies. Regarding the age at which the participants were submitted to a WES test, about half (45.9%) of the articles included adults, while 37.8% lacked age information or reported age only for individuals who were successfully diagnosed. For ID classification, the majority of papers did not report the instrument used for ID ascertainment or it was unclear. Most papers mentioned that patients were referred after specialist medical evaluations, such as those conducted by neurologists and geneticists, and/or described the patients' phenotypic characteristics according to the Human Phenotype Ontology (HPO). Less than 31.43% of studies reported using a standardized instrument to assess IQ, evaluation of developmental milestones, and adaptive skills or performance on cognitive tasks.

Considering sequencing technology, all studies included in the review had a coverage greater than 36.5 Mb of human protein coding regions (~18,000 genes). The HiSeq System (Illumina, Inc.) and SOLiD™ System are the most commonly used platforms (Tables 1 and 2). A few studies have used a combination of both (8.10%). For identifying single nucleotide polymorphism (SNPs) and indels in germline DNA data, the Genome Analysis Toolkit (GATK)-Broad Institute [50], was used in 51.35% of studies, (Table 1). However, almost one-third of the studies followed custom bioinformatic analysis pipelines. Most of the papers (88.57%) reported using Sanger sequencing, which is the standard procedure for SNPs and indel variant verification (Table 1).

The vast majority of studies reported that patients had a prior negative molecular diagnosis for traditional tests, such as chromosomal microarray (CMA), before the implementation of WES. Subsequently, WES was used as an alternative test after molecular screening. As an exception, Xiang et al. (2021) [51] used WES as the first-choice molecular diagnostic tool.

This review included articles published between 2010 and 2021, most of which were published in the last five years, between 2016 and 2021 (Table 1). To evaluate whether the molecular diagnosis rates could have been affected by the evolution of NGS technology, we plotted the rate of positive diagnoses according to the year of study execution/publication (Supplementary Figure S1). No clear temporal trend was observed. A lack of trend was also observed when considering the unit of analysis.

3.3. Quality assessment of studies

The risk of bias assessment and concerns regarding the applicability of the selected studies are summarized in Table 2 and Figure S2. More than 65% of the articles were considered to have a low risk of bias regarding patient selection, diagnostic criteria, and use and interpretation of the WES. Regarding the risk of bias and patient selection (domain 1), seven studies (judged as uncertain risk) did not report sufficient information regarding patient sampling or inclusion/exclusion criteria. Two studies (judged as high-risk) used secondary data based on a reanalysis of previous negative results. Thus, the sample selection and criteria were not well defined (Table 2). Regarding WES conduct and interpretation (domain 2), nine studies were classified as having an uncertain risk of bias for this domain, given that they used results obtained from different kit-platforms or customized pipelines. One study was judged as having a high probability of bias because it did not employ any methodology to confirm its findings, unlike the rest of the articles (Table 2). For the reference standard (domain 3) in all studies, the standard reference (diagnosis/clinical phenotype) was present in the patients prior to the implementation of WES. Therefore, all studies were judged to have a low risk of bias.

Regarding the applicability of the studies for the systematic review for patient selection (domain 1), 35 studies were classified as having low concern for applicability for the review. The remaining two studies (Li et al., 2019 and Al-Nabhani et al., 2018) [47,65] that directly used patients' data (reanalysis) were classified as having uncertain applicability, since the results provided were not comparable to others, as it was not the first time that a WES was performed in the sample. Regarding WES conduct and interpretation (domain 2), all studies were applicable for our purposes. Regarding clinical diagnosis (domain 3), all studies used WES after negative results in previous molecular tests, except for one (Xiang et al., 2021). Xiang et al. (2021) [78] applied WES as the first line of molecular diagnosis, which hindered its interpretability/comparability with other studies. Therefore, we classified it as having uncertain applicability.

3.4. Variant/gene characterization

3.4.1. Variant type

The vast majority of mutations reported in the literature comprise point mutations and indels, including inherited recessive variants and dominant DNMs. Only one

study reported maternal germ cell mosaicism in two cases [61]. At least one case of compound heterozygotes was detected in 10 studies [51,52,62,65,73–77,82]. At least one DNM was detected in 31 of the 37 studies (Figure 3). Twelve studies were aimed at detecting CNVs. For exome-based CNV detection, a comprehensive tool, such as medical resequencing analysis pipeline (MERAP), was used for CNV calling in 11 studies (Table 1). Of these, 5 studies reported CNVs in patients with molecular diagnoses (Table 2) [51,60,61,64,76]. CNVs confirmation by other methods, including multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), quantitative PCR (qPCR), and CNV-sequencing (CNV-seq), was reported in 3 of the 5 studies (Table 1) [51,60,64]. Additionally, Nouri et al. 2021 [69] reported CNVs in patients; however, the tool (pipeline) and confirmation results have not been reported.

3.4.2. Classification/interpretation of variants

More than half of the studies (56.76%) reported the variants considering the following classification: pathogenic, likely pathogenic, VUS, likely benign, or benign (Table 1), using the classification criteria suggested by the most comprehensive and up-to-date guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [83]. The remaining articles used specific classification. For example, Kvarnung (2018) [64] performed variant annotation using Annovar, a software tool used to annotate single nucleotide variants and indels, including examining their functional consequences on genes [84]. Schuurs-Hoeijmakers (2013) [75] annotated the variants according to the following criteria: gene linked to neurological phenotype, mRNA expression in brain, missense variant(s) predicted to be “disease/damage causing”, and high conservation among vertebrates.

In most studies, the molecular diagnosis of individuals is based on the identification of a variant classified as pathogenic/likely pathogenic. In general, VUS and variants that were not scored as pathogenic led to individuals without molecular diagnostics. Among the 37 included studies, 14 reported variants were only in diagnosed individuals and 23 studies additionally reported variants in individuals with an inconclusive molecular diagnosis of ID. In specific cases, based on sufficient clinical and functional evidence, the initial VUS variants were considered to have a positive diagnostic rate [81]. These results are mainly linked to novel genes associated with ID.

3.5. Molecular diagnosis rate meta-analysis

To estimate the overall molecular diagnosis of ID detected using WES, two meta-analyses were performed. The first accomplishes molecular diagnostic yield of all of the 37 included studies, while the second presents the yield due to detected DNMs in successful molecular diagnosis for the same studies (Figures 2 and 3, respectively).

The random-effects meta-analysis revealed an overall molecular diagnostic yield of 42% (95% CI: 35%–50%) (Figure 2). The forest plot presents an overall measure based on the proportions of positive molecular diagnoses (n positive patients/ n total patients) and is specific to each unit of analysis. The highest diagnostic yield was observed in the family study design ($n = 9$ articles, 56%; CI: 40–71%), followed by trio ($n = 22$ articles; rate of 41%; CI: 33–49%), cohort ($n = 4$ articles; rate of 40%; CI: 10–79%), and reanalysis studies ($n = 2$ articles, rate of 11%, CI: 0–82%). We found the greatest heterogeneity (I^2 value) for the reanalysis, followed by cohorts, trios, and families. Funnel plot asymmetry was not significant and there was no evidence of publication bias (Figure S3).

The secondary random-effects meta-analysis ($n = 37$ articles) revealed a molecular diagnostic yield due to DNMs of 11% (CI: 6–18%) (Figure 3). The highest diagnostic rate was observed in the trio category ($n = 22$ articles, rate of 25%; CI: 19–31%), followed by cohort ($n = 4$ articles, rate of 9%; CI: 1–61%), and reanalysis ($n = 2$ studies; rate of 6%; CI: 0–99%) studies. The lowest diagnostic rate was observed in the family category ($n = 9$ articles), with a yield of 1% (CI: 0–6%). Again, we found the greatest heterogeneity (I^2 value) for the reanalysis, followed by cohorts, trios, and families.

3.6. Functional gene sets enrichment analyses

A total of 1,097 genes (with unique EntrezID-Symbol) were reported in 37 studies. Of those, 573 were reported as having a mutation linked to a positive ID molecular diagnostic (“ID Molecular Diagnosis gene set”) (Supplementary Material Table S2) and 524 had VUS or nonpathogenic mutations, making the ID molecular diagnostic unfeasible (“Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set”) (Supplementary Material Table S3). A total of 77 genes were ascribed to both gene sets (Supplementary Material Table S4). Specifically, they were identified

as inconclusive ID molecular diagnostic cases, and other studies reported sufficient evidence to establish an association with ID (i.e., a novel ID gene). Therefore, these 77 genes were removed from the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set”. Finally, the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set” consisted of 447 genes (524 minus 77 genes) and the “ID Molecular Diagnosis gene set” set consisted of 573.

In the main functional enrichment analysis, a greater number of pathways and mechanisms were observed for the “ID Molecular Diagnosis gene set” compared to the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set.”. A summary of the most significant results and/or results representative of the range found for both gene sets is presented in Table 3 (full result in Supplementary Material Table S5).

3.6.1. Gene sets: ID diagnoses cases

For the “ID Molecular Diagnosis gene set,” 341 GO terms and 25 KEGG pathways were obtained (Table 3). Several pathways involved in development, neurodevelopment, neuromuscular processes, synapsis signaling, and cellular processes (involving cell cycle regulation, gene expression, and ion transport) have been identified.

Gene expression regulation was overrepresented in the functional analysis using GO terms. Exactly 17.45% ($n = 100$ genes) of set genes were annotated as positive regulation of gene expression. Other processes related to gene expression epigenetic regulation (involving chromatin remodeling and H3 histone methylation) and also related to immune system interferon type I production. Epigenetic function was also enhanced by the enrichment of miRNA motifs in the 3'-untranslated region. These genes were enriched for regulation by 83 miRNAs. Specific miRNAs, such as *MIR9*, *MIR19A*, *MIR19B*, *MIR128*, *MIR422*, and *MIR507* were observed.

A series of health conditions were also found, including circadian rhythm, cardiomyopathy, various cancers, and type II diabetes mellitus (Table 3). For the positional gene enrichment analysis, only the chromosome (chr) Xp11 gene set was statistically significant.

Secondary enrichment analysis, using the whole genome as a background, was consistent with the above-described findings for both biological processes and

miRNA motifs in the 3'-UTR region. Interestingly, we identified several pathways involved in stress response that did not appear in the analysis described above (Supplementary Material Table S6). For positional gene enrichment analysis, chrXp11, chr9q34, and chr16q24 loci were statistically significant.

3.6.2. Genes with unclear mutation effect on ID

The main functional enrichment analysis for the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set” revealed a few statistically significant potential mechanisms. We did not obtain any GO terms or miRNAs. This set was enriched for the regulation of blood volume and systemic vascular resistance. For positional gene enrichment analysis, 17.67% (n = 79 genes) of the set was enriched in chrXp11, 22, and chXq21, 22, 23, 24, 26, and 28 loci.

Secondary and less strict enrichment analysis revealed 305 GO term and 9 KEGG biological pathways. Approximately 13% (n = 59 genes) of genes in the set were represented by a process that mediates the transfer of information from one cell to another and were also the most statistically significant. Other biological processes are related to neurodevelopment and its regulation, processes involved in intracellular signaling (such as ERK and ERK2 cascade, regulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPKs) activity), regulators of blood volume and systemic vascular resistance, hypertrophic cardiomyopathy, regulation of response to stress, and the immune system.

The KEGG pathways as hypertrophic cardiomyopathy and intercellular junction were observed in the “ID Molecular Diagnosis gene set.” Epigenetic regulation by miRNAs has also been reported. These genes were enriched for regulation by 49 miRNAs. Noticeably, regulation by the genic products of *MIR9*, *MIR19A*, and *MIR19B* was also observed in the “ID Molecular Diagnosis gene set”. Positional gene enrichment analysis confirmed the loci identified in chrX (Supplementary Material Table S7).

4. DISCUSSION

This review showed that among patients with ID, WES testing accounted for an overall diagnostic rate of 42% (CI: 35–50%). The diagnostic yield was appreciably greater when both biological parents were evaluated or several affected family

members were tested. We also showed that the diagnostic rate specifically for DNMs was 11% (CI: 6–18%), supporting the fact that the WES test is useful to investigate unexplained ID. Genes carrying mutations used for assertive molecular diagnosis were enriched in several pathways. In addition to their expected roles in neurodevelopment, they were also enriched in epigenetic regulatory mechanisms and the immune system. Genes whose mutations provided inconclusive molecular diagnostics were enriched at several loci on the X chromosome, as well as in the regulation of blood volume and the systemic vascular resistance pathway.

4.1. Usefulness of WES in ID diagnostic yield

The diagnostic yield observed in this review (42%) was higher than that reported previously [11,13,14]. Srivastava (2019) [29] reported an overall yield of 36%, with 31% for isolated NDD, and 53% for NDD with associated comorbidities. Regarding the analyses of the trio design, the diagnostic yield in a clinical setting was approximately 30% [68,85], which was lower than that observed in this review (42%; CI: 35–50%). Despite making an extensive review of the total number of autosomal recessive IDs (including families studied via WES), Mir and Kuchay et al. (2019) [25] did not present a global estimate of diagnosis. It is important to emphasize that the estimate reported here is clearly related to the use of WES as an alternative approach, since all the papers, except one, included cases with a negative ID molecular diagnosis in previous traditional molecular tests. Data from our work do not allow us to infer the diagnostic rate of WES as a first-level approach to ID. A review study revealed that, among patients with NDDs (as GDD, ID, and/or ASD), WES outperforms the currently accepted first-tier test for NDDs by 10–28%, assuming a range of 30–43% for WES and 15–20% for chromosomal microarray (CMA). WES produces a higher molecular diagnostic yield than CMA, so by this criterion, it should become a first-tier test [29].

The high diagnostic rate observed in our study was obtained from a total sample with a higher representation of male individuals and recessive mutations (as a consequence of inbreeding). The high rate of male subjects is consistent with previous knowledge of ID [16], explained by factors such as sex chromosome involvement, hormonal regulation of genes, sex-specific imprinting, and female protective effects, among others [86,87]. Consanguinity was present in 54.3% of

the studies, which led to a high rate of detection of recessive mutations. It enhanced the usefulness of WES as a diagnostic tool for ID families, since the highest diagnostic yield was obtained in the family category, achieving 56%.

Many sources of heterogeneity in the ID molecular yields were observed across the included studies. Among them, we can highlight the age at ID clinical diagnosis, age at WES test, heterogeneity of phenotypes, differences in sequencing, variant calling methodologies, and study design. These differences can impact the interpretation of results owing to difficulties in ID clinical assessment criteria and the emergence of health complications throughout life as a consequence of ID [88,89]. The likelihood of identifying disease-causing variants is reduced in the absence of key elements in the clinical description of patients [90]. Considering that classic or core phenotypic characteristics may not yet have been completely developed in infancy [91,92] and that IQ cannot be assessed at that time in life, molecular diagnosis may be inconclusive because the phenotype is not well characterized. Contrastingly, adult patients lacking proper treatment or care throughout life may develop health issues as a consequence of ID, which may also hamper the association between clinical outcomes and mutation findings through WES [93]. Efforts are still needed to establish an optimal time window for diagnosis via WES.

Clinical outcomes such as ID severity and diagnostic criteria also varied across the included studies. The description of standardized methods for assessing IQ or cognitive skills was often difficult to identify and resulted in an absence/unclear characterization of patient phenotypes in 20 of the included studies. On the other hand, all studies, except one, included in this review, have chosen patients who have sometimes gone through a diagnostic odyssey in reference centers, with a large number of clinical evaluations and negative results in previous molecular tests, with uncertain diagnosis at the time of study. In this sense, we consider that the phenotypic complexity of ID was represented by the studies included in the review; therefore, the observed diagnostic rate may be a reliable estimate.

Differences in sequencing, data processing, and variant calling pipeline methods across studies are another possible source of variability in the rates of diagnosis found in this review. The different methods used in WES may lead to differences in nucleotide incorporation error rates [94–96] and differences in DNA target region selection [97]. However, all of these factors may have limited

comparability. There were small differences in sensitivity or specificity between kits used to target exons and platforms, with the HiSeq System (Illumina, Inc.) and SOLiD™ System, the most commonly used platforms. We did not consider these aspects to be relevant factors of bias, especially if the results of the study were confirmed using Sanger sequencing. The most frequently used data processing workflow in these studies was the GATK (43.24%), and 32.46% used a custom bioinformatic analysis pipeline. CNVs analysis from WES data was recently incorporated. Almost one-third of the papers explicitly report the implementation of an additional, more efficient pipeline for CNV detection. This represents an incredible advance in WES optimization, as it can be used without prior microarray analysis [98]. However, this requires that the detected variants be confirmed using conventional methods for diagnostic purposes.

Regarding the effect of the time of publication on ID molecular diagnostic rates, although the frequency of studies increased over the years, following the development of NGS technology and decrease in exam costs, a trend of increase or decrease in molecular diagnostic yield on the overall estimate was not observed. No trend in the estimates was observed across the categorization due to the study design. (Supplementary Figure S1). A more exhaustive analysis in this regard would require greater homogeneity in WES detection methodologies among the studies.

Differences in the pathogenicity classification criteria may also have affected the yield rate. For classification of variants (pathogenic, likely pathogenic, VUS, likely benign, or benign), the current gold standard, the ACMG guidelines were used in 56.7% of the studies. This low frequency can be partially explained by the fact that many of the studies were available before the ACMG criteria were published in 2015. The use of a customized pipeline and a variant classification different from that of ACMG was considered an unclear risk of bias. The only study that did not report Sanger sequencing confirmation was considered to have an increased risk of bias in reporting its results. Despite the better quality and read-length sequence data from current sequencing technologies [99], Sanger sequencing to confirm sequence variants is still recommended for diagnostic purposes [100]. False-negative and positive results may be attributed to human error or as a result of poor base-calling software [101]. Even though it is difficult to speculate on the possible bias involved in papers that do not confirm variants

through Sanger sequencing, we can assume that false positives would be lower using Sanger sequencing.

To our knowledge, the current study is the first to describe the diagnostic yield of WES stratified by study design category. Given the inclusion and exclusion criteria used in our search strategy, we were able to provide an estimate of the overall molecular diagnosis for ID based on WES. We were also able to assess the contribution of DNM and the study design to the ID molecular diagnostic rate. This approach may contribute to identifying better strategies and designs for exploring the complexity of ID phenotypes. Cohort, family, trio, and dataset reanalysis studies have been shown to be valid designs for the application of WES [102]. As expected, the non-consanguineous parent trio-and cohort-type studies obtained an overall lower diagnostic rate compared to family studies, in which clinical presentations may be confirmed or shared with family members. DNMs were identified in 83.78% of studies, resulting in a diagnostic rate of 11%. DNMs are most frequently reported in trio analysis design, a strategy that almost exclusively allows for the detection of DNMs by WES [19,22]. We also report the highest contribution of DNMs to ID in this design, which yielded 25% (CI: 19–31%). DNMs were also relevant to the cohort study design (diagnostic rate of 9%; CI: 1–61%). However, it should be noted that in this design, the parents (when available) were also evaluated to verify the inheritance pattern of a suspected DNM. Although recessive causal mutations are expected to be enriched and are the main cause of ID in populations with high rates of inbreeding, pathogenic DNMs can also be linked to ID [103]. We observed the lowest diagnostic rate in this design category (1%; CI: 1–6 %).

The presence of VUS in disease-relevant genes may be a challenge for physicians and families alike and requires detailed analysis, including the elucidation of inheritance through parental analysis [104]. Given the continuous improvement in bioinformatics tools (alignment and variant-calling tools), literature, and genomics database updating [105,106], the reanalysis of WES raw data has become a frequent and promising approach that could improve diagnostic rates in patients without an initial molecular etiology [105,107]. Negative and uncertain results can be reanalyzed from stored raw sequencing data or through the reinterpretation of all variants in the file primarily detected. Resequencing/reanalysis has been reported to result in ~15% new molecular

diagnoses owing to the addition of family members and new gene-disease associations [24,108], which focuses on updates of variants reported as pathogenic/likely pathogenic in public databases of clinical interest [109]. In this review, only two studies reanalyzed a dataset obtained by WES [47,65]. Assuming that patients undergoing resequencing could have a more difficult diagnosis, this approach was the one with the highest heterogeneity, with a diagnostic yield of 11% for general mutations and 6% for DNMs. In both studies, the window of time between the two analyses was less than 2 years. Reanalysis of the exome sequencing data is recommended every 1–3 years [105]. Our study could not detect a clear temporal trend in the rate of diagnosis. However, in this sense, we want to emphasize the relevance of reanalysis (supported by technological and bioinformatic progress) as a practice that has the potential to generate additional contributions to the diagnosis and etiology of ID. In the context of the dynamic and multidisciplinary nature of the ID diagnostic process, the importance of the analysis and, in some cases, reanalysis of exome data, including the reverse phenotyping approach (defined as a strategy used to refine the phenotype based on the interpretation of genetic data [110]) could be helpful to solve the diagnostic ascertainment pitfall. The WES reanalysis, in addition to several ID patient follow up times along life, and to a detailed clinical evaluation, could be an important toolkit to refine the ID diagnosis. The reverse phenotyping approach has been used for the diagnosis of other NDD and epilepsy [111–113], and it has revealed new candidate genes and atypical phenotypes for ID and Autism Spectrum Disorder [78]. Our results support the importance of reporting mutations found in patients who are “initially” categorized as unsolved cases, in most cases because they have VUS-type variants. A total of 77 genes reported in patients with inconclusive diagnoses have been associated with ID in other studies. Novel ID genes can be identified by observing variations in the same gene in multiple unrelated ID patients with phenotypic similarity, which underlines the importance of detailed documentation of patient phenotypes and sharing data between clinical laboratories and research initiatives [114]. It does reinforce and encourages the use of the freely accessible Genematcher tool [115,116], as an example, to reduce the gap between clinical and research related information. In retrospect, individuals with variants of these 77 genes may have been

underdiagnosed. Recent studies have incorporated statistical analysis to identify clinical conditions associated with the molecular diagnosis of ID [60,69].

4.2. Biological and functional characterization of genes reported in the literature

The search for feature enrichment is a widely used method to characterize a set of genes, given that it is difficult to distinguish the contribution of each gene specifically owing to the pleiotropic effect of some genes. Even well-studied genes should be revisited iteratively to identify novel features that previous technologies could not detect [99]. Enrichment analysis might be an interesting approximation and contribution to the knowledge of the molecular mechanisms underlying ID. Therefore, it constitutes a potential tool for the elucidation of new biological processes or novel genes involved/associated with already known or emerging processes in the etiology of ID.

The genes included in the “ID Molecular Diagnosis gene set” are mainly involved in classical processes involved in neurodevelopment and nervous system functioning, such as central nervous system development, synapse processes, cognition, memory, learning, and neuromuscular and cellular processes, which are widely described in the literature [117–120]. In addition, enrichment analysis revealed many biological processes somewhat less explored in the literature, but potentially involved with ID: epigenetic regulation, circadian rhythm, immune system activation, and disease-associated conditions (cardiomyopathies, diabetes, and cancer).

Regarding epigenetic changes, the regulation of histone modifications, such as histone methylation, as well as post-transcriptional expression modulation through microRNAs, were enriched pathways among the genes currently used for ID diagnosis. Chromatin organization, which controls compartmentalization of distinct functional domains, has a fundamental impact on the correct temporal and spatial gene expression required for proper development and cognition in the mammalian genome [121,122]. In addition to known ID genes, such as the X-linked gene encoding methyl-CpG binding protein 2 (MECP2), which mutation leads to Rett Syndrome [123], an increasing number of genes involved in chromatin structure and epigenetic regulation due to altered brain plasticity [124] have been implicated in various developmental disorders, including ID [125]. For instance, among the genes reported in the diagnostic gene set, mutations in lysine demethylase 5C (*KDM5C*) [126,127] and euchromatic histone lysine

methyltransferase 1 (*EHMT1*) support the dynamic nature of histone methylation in activity-dependent gene transcription and neuronal plasticity [128–130]. Impaired chromatin regulation due to mutations in *EHMT1* may lead to pathophysiological changes in neuronal excitability, resulting in aberrant network activity and seizures, which positively or negatively regulate transcriptional enhancers [124]. Mutations in *KDM5C* are associated with X-linked NDDs, with intellectual disability as a core feature [131]. The processes involved in the regulation of histone modifications were confirmed using secondary enrichment analyses.

MicroRNAs, which are abundant in the nervous system, play key roles in development and are likely mediators of plasticity [132,133]. Dysfunction of miRNA signaling contributes to neurodevelopmental disorders, such as fragile X syndrome (FXS) and RTT, as well as complex behavioral disorders, including schizophrenia, drug addiction, and depression [134,135]. This review supports the role of regulation through specific miRNAs (*MIR9*, *MIR19A*, *MIR19B*, and *MIR128*) in the diagnostic gene set used in the current diagnosis. *MIR9* in particular is an important regulator of brain segmentation [136], neuronal maturation [137,138], and neurogenesis and angiogenesis during brain development [139]. Similarly, FXS results from the loss of function of fragile X mental retardation protein, which has been reported to be regulated by *MIR128* and *MIR9* [140]. *MIR19A* and *MIR19B* were recently shown to be enriched in neural progenitor cells in the adult hippocampus [141]. Epigenetic gene control is an intrinsic mechanism of normal brain development, and abnormalities in the molecules associated with this mechanism are known to cause congenital neurodevelopmental diseases, including ID [142]. Because epigenetic mechanisms are reversible and variable, unlike most mutational changes, epigenetic information can potentially be used as a disease marker and target for disease treatment [142].

Circadian rhythm disturbances can also affect health. A significant number of individuals with developmental disabilities have disordered sleep, although prevalence estimates vary from 13 to 86% [143]. One of the most significant aspects of development is the establishment of sleep states [144], which is important for the underlying neural plasticity [145]. One potential mechanism

whereby prenatal stress, which has direct effects on neurogenesis, neuronal migration, cellular differentiation, and synaptic refinement that occur during the prenatal period [146], influences fetal development is by modifying the programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, a major system controlling the organism's response to stress and regulating certain circadian activity [147]. Biological processes related to circadian rhythms open new possibilities for further studies to help elucidate their mechanism of action on ID.

The production of inflammatory molecules was also over-represented in the diagnostic gene set. Over the last few years, inflammation has been recognized as a trigger for neonatal encephalopathy and seizures, and evidence has indicated that this inflammation plays a role in the long-term neuronal damage experienced by survivors [148]. Among these genes, DExH-box helicase 58 (*DHX58*), which facilitates ATP-dependent unwinding of RNA secondary structures, has recently been implicated in neurodevelopmental disorders and ID [62,149]. However, the mechanisms underlying these associations are not yet known. The possible neuroprotective effects that could be achieved by using anti-inflammatory drugs in the treatment of encephalopathy has been investigated [148]. Our data suggest that the potential role of immune/inflammation-related proteins in the context of neurodevelopment should be explored in future clinical and molecular investigations. The role of processes involved in the immunological system in the etiology of ID should be explored.

Some genes within the "ID Molecular Diagnosis gene set" were found to be associated with various health conditions. People with intellectual disabilities are 2.46 times more likely to have diabetes than controls [150]. Hexokinase 1 (*HK1*) phosphorylates glucose to glucose-6-phosphate, the first rate-limiting step in glycolysis. Variants of *HK1* have been identified in families with neurodevelopmental disorders associated with developmental delay [151]. One study compared cancer-related mortality between people with and without ID in the Netherlands. Death due to cancer is approximately 1.5 times more frequent among people with ID [152]. In our functional analysis, many genes were significantly enriched in cancer-related pathways. Regarding cardiac diseases, in ID individuals, congenital heart defect is a more frequent congenital malformation

[153]. A study reported that Australian people with ID, who had heart conditions and epilepsy, were more than twice as likely to die during the 10-year study period than people without heart conditions or epilepsy [154]. These results are consistent with the high prevalence of these health conditions in patients with ID, and they raise the prognostic possibilities for some patients.

With respect to the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis” gene set, only one biological pathway associated with renin-angiotensin systems (RAS) was observed. The brain-specific RAS plays an essential role in brain homeostasis [155]. Growing evidence indicates that the brain RAS affects microglial polarization, neuroinflammation, brain homeostasis, alterations in neurotransmitter secretion, and cognition [156–158], but there are still certain limitations and controversies regarding the mechanisms involved. Recent studies have shown that in the brain, the angiotensin-converting enzyme 2 (*ACE2*) gene is expressed in glial cells and neurons [159,160] and has been associated with neuronal inflammation and neuronal disorders caused by viral infection [161]. Therefore, it is important to conduct further studies to establish possible associations between this pathway and ID.

One group of ID-associated genes is located on the X chromosome, which is associated with sex-linked inheritance in this pathology, due, at least in part, to the fact that the prevalence of ID is more important in male hemizygous for a pathogenic variant in recessive X-linked conditions. The results of positional gene enrichment of the "Inconclusive Molecular Diagnosis of ID" gene set, could reveal specific genes of interest in aberrant regions of the X chromosome that deserve further study, for example, the accessibility and expression of this specific chromosomal region in different tissues. Using the whole genome as background, other pathways, such as those related to the ERK/MAPKs signaling pathway, cell junction organization, and protein signaling through phosphorylation, among others, were also observed, revealing the potential role of this set of genes. Neurodevelopmental disorders arising from mutations in these pathways exhibit related neurological phenotypes including cognitive dysfunction, autism, and ID [162]. Importantly, our secondary analysis found convergence between classical processes related to neurodevelopment and the functioning of the nervous system overlapping with diagnostic genes, as discussed above. For example,

these pathways could be prioritized when performing reanalyses of these variants. This gene set deserves further functional studies to allow the investigation of possible new associations with the pathophysiology or even causal mechanisms of ID.

4.3 Strengths and limitations

This study has certain limitations. This review encompasses the wide heterogeneity and phenotypic complexity of ID. Therefore, it is possible that some confusion in estimating the diagnosis rate arises from related phenotypes, for example, phenotypes related to ASD, which sometimes cannot be distinguished from ID. Second, a poor representation of the global population is noteworthy, as there is a lack of information on ID from Latin America, North America, Africa, and Oceania, which could make it difficult to derive a general assessment of ID diagnostic rates in a broader setting. More studies on less-represented continents should be the focus of future studies. Another limitation was the classification of the study design. In many cases, the study design is mixed. For example, proband-only and trio-WES or family and trio-WES analyses, which limited our ability to establish 100% homogeneous WES-design categories in some studies. Thus, the DNMs detection rate may have been overestimated in this group. The reanalysis design comprises a mixture of designs, which can reflect its high estimated heterogeneity. We decided to analyze this set separately because it may not represent the overall sample that was assessed for the first time through WES. Although an estimate of the diagnostic rate considering WES as a first clinical approach could provide important information for future directions for WES usage, the data presented in this study do not allow us to infer the diagnostic rate of WES as a first-tier approach for ID. Of the 37 included studies, 36 described the use of WES in patients with previously negative molecular diagnostic tests. Although it is the current indication for ID, it is difficult to determine the extent to which this is biased by the reported diagnostic rates. Another important aspect is that possible differences in diagnosis rates resulting from different sequencing platforms or analyses (variant calls and classifications), within or between studies, were not considered. WES is a term commonly used in the literature to refer to large-scale exome sequencing. Even though the sequencing covers majority of the exon regions of the nuclear genome (generally 95 -98% of exome is sequenced), a small part of the exome is not tagged by the

technique used in this approach. Thus, the term “sequencing most of the exome” would be more appropriate to refer to that. In this study, the term WES was used since it was one of our search key-words and it is also used in the included studies. Regarding our functional enrichment analysis, the list included in the “Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set” was underestimated. Several studies have not reported the variants observed in subjects with inconclusive diagnoses. Therefore, caution should be exercised when interpreting the results. This limitation reinforces the need for further studies to report VUS findings. Moreover, functional secondary analysis, using the whole genome as background, may lead to a false positive, even though they confirmed the main mechanisms enriched for the “ID Molecular Diagnosis gene set”. Therefore, caution is needed when interpreting the results.

Importantly, most of the papers included in this review presented a low probability of bias. The literature retrieved for this review was composed of studies of 10 unrelated probands or more, which could be considered to have a reduced publication bias (as demonstrated by the asymmetry analysis of the funnel plot), as well as a better level of evidence in ID diagnostic research, with a minimum reported diagnostic rate of 9.43% [16]. We used a meta-analysis as a systematic method to synthesize the results from different empirical studies, providing a more precise and reliable estimate.

To our knowledge, this is the first review and meta-analysis focused on the WES diagnostic rate involving only patients with ID, encompassing their clinical heterogeneity, and that complemented this analysis with a functional genetics approach. Furthermore, new hypotheses of associations between genes and biological processes involved in the etiology or pathophysiology of ID have been postulated, opening new possibilities for future studies.

5. CONCLUSIONS

Our results support the use of WES as an approach of choice that offers clinical and research benefits for ID diagnosis. WES testing accounts for an overall diagnostic rate of 42%, with special contribution from studies involving genetic testing of biological parents or several affected family members. The diagnostic rate for DNMs, although lower (11%), supports the fact that the WES test is useful to investigate the causes of sporadic ID. Our results also revealed potential mechanisms impaired in patients with ID. Given the pleiotropic character of the

mutated genes, the overall genes identified through WES identified potential biological deficits in epigenetic regulatory mechanisms, the immune system, and circadian rhythm, in addition to neurodevelopment. Genes from inconclusive molecular diagnostic sets were enriched in the blood volume regulation and systemic vascular resistance pathways. Future studies should explore the relationship between this pathway and ID to better understand and provide insights about the molecular mechanisms underlying ID.

Funding

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional - INCT-INaGeMP (Porto Alegre 90035903, Brazil)

Financial support for grants:

465549/2014-4/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
88887.136366/2017-00/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

17/2551-0000521-0/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

References

- [1] American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, American Psychiatric Association, 2013. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- [2] M.J. Tassé, R. Luckasson, R.L. Schalock, The Relation Between Intellectual Functioning and Adaptive Behavior in the Diagnosis of Intellectual Disability, *Intellect. Dev. Disabil.* 54 (2016) 381–390. <https://doi.org/10.1352/1934-9556-54.6.381>.
- [3] M. Marti, M.I.P. Millan, J.I. Young, K. Walz, Intellectual disability, the long way from genes to biological mechanisms, *J. Transl. Genet. Genomics.* 4 (2020) 104–113. <https://doi.org/10.20517/jtgg.2020.10>.
- [4] J.B. Moeschler, M. Shevell, Committee on Genetics, Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental

- delays, *Pediatrics*. 134 (2014) e903-918.
<https://doi.org/10.1542/peds.2014-1839>.
- [5] L.E.L.M. Vissers, C. Gilissen, J.A. Veltman, Genetic studies in intellectual disability and related disorders, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 9–18.
<https://doi.org/10.1038/nrg3999>.
- [6] B.E. Slatko, A.F. Gardner, F.M. Ausubel, Overview of Next-Generation Sequencing Technologies, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 122 (2018) e59.
<https://doi.org/10.1002/cpmb.59>.
- [7] M.R. Johnson, K. Shkura, S.R. Langley, A. Delahaye-Duriez, P. Srivastava, W.D. Hill, O.J.L. Rackham, G. Davies, S.E. Harris, A. Moreno-Moral, M. Rotival, D. Speed, S. Petrovski, A. Katz, C. Hayward, D.J. Porteous, B.H. Smith, S. Padmanabhan, L.J. Hocking, J.M. Starr, D.C. Liewald, A. Visconti, M. Falchi, L. Bottolo, T. Rossetti, B. Danis, M. Mazzuferi, P. Foerch, A. Grote, C. Helmstaedter, A.J. Becker, R.M. Kaminski, I.J. Deary, E. Petretto, Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease, *Nat. Neurosci.* 19 (2016) 223-+. <https://doi.org/10.1038/nn.4205>.
- [8] G. Bertier, K. Sénécal, P. Borry, D.F. Vears, Unsolved challenges in pediatric whole-exome sequencing: A literature analysis, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 54 (2017) 134–142.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2016.1275516>.
- [9] A. Iglesias, K. Anyane-Yeboah, J. Wynn, A. Wilson, M. Truitt Cho, E. Guzman, R. Sisson, C. Egan, W.K. Chung, The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 16 (2014) 922–931. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.58>.

- [10] S. Srivastava, J.S. Cohen, H. Vernon, K. Barañano, R. McClellan, L. Jamal, S. Naidu, A. Fatemi, Clinical whole exome sequencing in child neurology practice, *Ann. Neurol.* 76 (2014) 473–483. <https://doi.org/10.1002/ana.24251>.
- [11] ACMG Board of Directors, Points to consider in the clinical application of genomic sequencing, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 14 (2012) 759–761. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.74>.
- [12] Deciphering Developmental Disorders Study, Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders, *Nature.* 519 (2015) 223–228. <https://doi.org/10.1038/nature14135>.
- [13] C.S. Ku, C. Polychronakos, E.K. Tan, N. Naidoo, Y. Pawitan, D.H. Roukos, M. Mort, D.N. Cooper, A new paradigm emerges from the study of de novo mutations in the context of neurodevelopmental disease., *Mol. Psychiatry.* 18 (2013) 141–153. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.58>.
- [14] D. Levenson, Whole-exome sequencing emerges as clinical diagnostic tool: Testing method proves useful for diagnosing wide range of genetic disorders, *Am. J. Med. Genet. A.* 164 (2014) ix–x. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36385>.
- [15] R.L.P. Santos-Cortez, V. Khan, F.S. Khan, Z.-U.-N. Mughal, I. Chakchouk, K. Lee, M. Rasheed, R. Hamza, A. Acharya, E. Ullah, M.A.N. Saqib, I. Abbe, G. Ali, M.J. Hassan, S. Khan, Z. Azeem, I. Ullah, M.J. Bamshad, D.A. Nickerson, I. Schrauwen, W. Ahmad, M. Ansar, S.M. Leal, Novel candidate genes and variants underlying autosomal recessive neurodevelopmental disorders with intellectual disability., *Hum. Genet.* 137 (2018) 735–752. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1928-6>.

- [16] E.Q. Vianna, R.M. Piergiorgio, A.P. Gonçalves, J.M. Dos Santos, V. Calassara, C. Rosenberg, A.C.V. Krepischi, R.T. Boy da Silva, S.R. Dos Santos, M.G. Ribeiro, F.B. Machado, E. Medina-Acosta, M.M.G. Pimentel, C.B. Santos-Rebouças, Understanding the Landscape of X-linked Variants Causing Intellectual Disability in Females Through Extreme X Chromosome Inactivation Skewing., *Mol. Neurobiol.* 57 (2020) 3671–3684. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01981-8>.
- [17] F.F. Hamdan, J. Gauthier, Y. Araki, D.-T. Lin, Y. Yoshizawa, K. Higashi, A.-R. Park, D. Spiegelman, S. Dobrzyńska, A. Piton, H. Tomitori, H. Daoud, C. Massicotte, E. Henrion, O. Diallo, S2D Group, M. Shekarabi, C. Marineau, M. Shevell, B. Maranda, G. Mitchell, A. Nadeau, G. D’Anjou, M. Vanasse, M. Srour, R.G. Lafrenière, P. Drapeau, J.C. Lacaille, E. Kim, J.-R. Lee, K. Igarashi, R.L. Haganir, G.A. Rouleau, J.L. Michaud, Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability, *Am. J. Hum. Genet.* 88 (2011) 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.001>.
- [18] I. Iossifov, B.J. O’Roak, S.J. Sanders, M. Ronemus, N. Krumm, D. Levy, H.A. Stessman, K.T. Witherspoon, L. Vives, K.E. Patterson, J.D. Smith, B. Paepker, D.A. Nickerson, J. Dea, S. Dong, L.E. Gonzalez, J.D. Mandell, S.M. Mane, M.T. Murtha, C.A. Sullivan, M.F. Walker, Z. Waqar, L. Wei, A.J. Willsey, B. Yamrom, Y. Lee, E. Grabowska, E. Dalkic, Z. Wang, S. Marks, P. Andrews, A. Leotta, J. Kendall, I. Hakker, J. Rosenbaum, B. Ma, L. Rodgers, J. Troge, G. Narzisi, S. Yoon, M.C. Schatz, K. Ye, W.R. McCombie, J. Shendure, E.E. Eichler, M.W. State, M. Wigler, The

- contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder.,
Nature. 515 (2014) 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>.
- [19] J.F. McRae, S. Clayton, T.W. Fitzgerald, J. Kaplanis, E. Prigmore, D. Rajan, A. Sifrim, S. Aitken, N. Akawi, M. Alvi, K. Ambridge, D.M. Barrett, T. Bayzetinova, P. Jones, W.D. Jones, D. King, N. Krishnappa, L.E. Mason, T. Singh, A.R. Tivey, M. Ahmed, U. Anjum, H. Archer, R. Armstrong, J. Awada, M. Balasubramanian, S. Banka, D. Baralle, A. Barnicoat, P. Batstone, D. Baty, C. Bennett, J. Berg, B. Bernhard, A.P. Bevan, M. Bitner-Glindzicz, E. Blair, M. Blyth, D. Bohanna, L. Bourdon, D. Bourn, L. Bradley, A. Brady, S. Brent, C. Brewer, K. Brunstrom, D.J. Bunyan, J. Burn, N. Canham, B. Castle, K. Chandler, E. Chatzimichali, D. Cilliers, A. Clarke, S. Clasper, J. Clayton-Smith, V. Clowes, A. Coates, T. Cole, I. Colgiu, A. Collins, M.N. Collinson, F. Connell, N. Cooper, H. Cox, L. Cresswell, G. Cross, Y. Crow, M. D'Alessandro, T. Dabir, R. Davidson, S. Davies, D. de Vries, J. Dean, C. Deshpande, G. Devlin, A. Dixit, A. Dobbie, A. Donaldson, D. Donnai, D. Donnelly, C. Donnelly, A. Douglas, S. Douzgou, A. Duncan, J. Eason, S. Ellard, I. Ellis, F. Elmslie, K. Evans, S. Everest, T. Fendick, R. Fisher, F. Flinter, N. Foulds, A. Fry, A. Fryer, C. Gardiner, L. Gaunt, N. Ghali, R. Gibbons, H. Gill, J. Goodship, D. Goudie, E. Gray, A. Green, P. Greene, L. Greenhalgh, S. Gribble, R. Harrison, L. Harrison, V. Harrison, R. Hawkins, L. He, S. Hellens, A. Henderson, S. Hewitt, L. Hildyard, E. Hobson, S. Holden, M. Holder, S. Holder, G. Hollingsworth, T. Homfray, M. Humphreys, J. Hurst, B. Hutton, S. Ingram, M. Irving, L. Islam, A. Jackson, J. Jarvis, L. Jenkins, D. Johnson, E. Jones, D. Josifova, S. Joss, B. Kaemba, S. Kazembe, R. Kelsell, B. Kerr, H. Kingston, U. Kini, E. Kinning,

G. Kirby, C. Kirk, E. Kivuva, A. Kraus, D. Kumar, V.K.A. Kumar, K. Lachlan, W. Lam, A. Lampe, C. Langman, M. Lees, D. Lim, C. Longman, G. Lowther, S.A. Lynch, A. Magee, E. Maher, A. Male, S. Mansour, K. Marks, K. Martin, U. Maye, E. McCann, V. McConnell, M. McEntagart, R. McGowan, K. McKay, S. McKee, D.J. McMullan, S. McNerlan, C. McWilliam, S. Mehta, K. Metcalfe, A. Middleton, Z. Miedzybrodzka, E. Miles, S. Mohammed, T. Montgomery, D. Moore, S. Morgan, J. Morton, H. Mugalaasi, V. Murday, H. Murphy, S. Naik, A. Nemeth, L. Nevitt, R. Newbury-Ecob, A. Norman, R. O'Shea, C. Ogilvie, K.-R. Ong, S.-M. Park, M.J. Parker, C. Patel, J. Paterson, S. Payne, D. Perrett, J. Phipps, D.T. Pilz, M. Pollard, C. Pottinger, J. Poulton, N. Pratt, K. Prescott, S. Price, A. Pridham, A. Procter, H. Purnell, O. Quarrell, N. Ragge, R. Rahbari, J. Randall, J. Rankin, L. Raymond, D. Rice, L. Robert, E. Roberts, J. Roberts, P. Roberts, G. Roberts, A. Ross, E. Rosser, A. Saggar, S. Samant, J. Sampson, R. Sandford, A. Sarkar, S. Schweiger, R. Scott, I. Scurr, A. Selby, A. Seller, C. Sequeira, N. Shannon, S. Sharif, C. Shaw-Smith, E. Shearing, D. Shears, E. Sheridan, I. Simonic, R. Singzon, Z. Skitt, A. Smith, K. Smith, S. Smithson, L. Sneddon, M. Splitt, M. Squires, F. Stewart, H. Stewart, V. Straub, M. Suri, V. Sutton, G.J. Swaminathan, E. Sweeney, K. Tatton-Brown, C. Taylor, R. Taylor, M. Tein, K. Temple, J. Thomson, M. Tischkowitz, S. Tomkins, A. Torokwa, B. Treacy, C. Turner, P. Turnpenny, C. Tysoe, A. Vandersteen, V. Varghese, P. Vasudevan, P. Vijayarangakannan, J. Vogt, E. Wakeling, S. Wallwark, J. Waters, A. Weber, D. Wellesley, M. Whiteford, S. Widaa, S. Wilcox, E. Wilkinson, D. Williams, N. Williams, L. Wilson, G. Woods, C. Wragg, M. Wright, L. Yates,

- M. Yau, C. Nellaker, M. Parker, H.V. Firth, C.F. Wright, D.R. FitzPatrick, J.C. Barrett, M.E. Hurles, Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders, *Nature*. 542 (2017) 433-+. <https://doi.org/10.1038/nature21062>.
- [20] B.J. O’Roak, L. Vives, W. Fu, J.D. Egertson, I.B. Stanaw, I.G. Phelps, G. Carvill, A. Kumar, C. Lee, K. Ankenman, J. Munson, J.B. Hiatt, E.H. Turner, R. Levy, D.R. O’Day, N. Krumm, B.P. Coe, B.K. Martin, E. Borenstein, D.A. Nickerson, H.C. Mefford, D. Doherty, J.M. Akey, R. Bernier, E.E. Eichler, J. Shendure, Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders., *Science*. 338 (2012) 1619–1622. <https://doi.org/10.1126/science.1227764>.
- [21] S.J. Sanders, X. He, A.J. Willsey, A.G. Ercan-Sencicek, K.E. Samocha, A.E. Cicek, M.T. Murtha, V.H. Bal, S.L. Bishop, S. Dong, A.P. Goldberg, C. Jinlu, J.F. Keaney, L. Klei, J.D. Mandell, D. Moreno-De-Luca, C.S. Poultney, E.B. Robinson, L. Smith, T. Solli-Nowlan, M.Y. Su, N.A. Teran, M.F. Walker, D.M. Werling, A.L. Beaudet, R.M. Cantor, E. Fombonne, D.H. Geschwind, D.E. Grice, C. Lord, J.K. Lowe, S.M. Mane, D.M. Martin, E.M. Morrow, M.E. Talkowski, J.S. Sutcliffe, C.A. Walsh, T.W. Yu, Autism Sequencing Consortium, D.H. Ledbetter, C.L. Martin, E.H. Cook, J.D. Buxbaum, M.J. Daly, B. Devlin, K. Roeder, M.W. State, Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci, *Neuron*. 87 (2015) 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.016>.
- [22] P.J. Short, J.F. McRae, G. Gallone, A. Sifrim, H. Won, D.H. Geschwind, C.F. Wright, H.V. Firth, D.R. FitzPatrick, J.C. Barrett, M.E. Hurles, De novo

- mutations in regulatory elements in neurodevelopmental disorders, *Nature*. 555 (2018) 611–616. <https://doi.org/10.1038/nature25983>.
- [23] M. Ilyas, A. Mir, S. Efthymiou, H. Houlden, The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing, *F1000Research*. 9 (2020). <https://doi.org/10.12688/f1000research.16315.1>.
- [24] V. Shashi, A. McConkie-Rosell, K. Schoch, V. Kasturi, C. Rehder, Y.H. Jiang, D.B. Goldstein, M.T. McDonald, Practical considerations in the clinical application of whole-exome sequencing, *Clin. Genet*. 89 (2016) 173–181. <https://doi.org/10.1111/cge.12569>.
- [25] Y.R. Mir, R.A.H. Kuchay, Advances in identification of genes involved in autosomal recessive intellectual disability: a brief review., *J. Med. Genet*. 56 (2019) 567–573. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105821>.
- [26] D.J. Michelson, R.D. Clark, Optimizing Genetic Diagnosis of Neurodevelopmental Disorders in the Clinical Setting., *Clin. Lab. Med*. 40 (2020) 231–256. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.05.001>.
- [27] M. Shakiba, M. Keramatipour, Effect of Whole Exome Sequencing in Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism and Neurogenetic Disorders., *Iran. J. Child Neurol*. 12 (2018) 7–15.
- [28] A.B. Wilfert, A. Sulovari, T.N. Turner, B.P. Coe, E.E. Eichler, Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications, *Genome Med*. 9 (2017) 101. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0498-x>.
- [29] S. Srivastava, J.A. Love-Nichols, K.A. Dies, D.H. Ledbetter, C.L. Martin, W.K. Chung, H.V. Firth, T. Frazier, R.L. Hansen, L. Prock, H. Brunner, N. Hoang, S.W. Scherer, M. Sahin, D.T. Miller, NDD Exome Scoping Review

- WorkGroup, Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 21 (2019) 2413–2421. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0554-6>.
- [30] F.F. Hamdan, J. Gauthier, Y. Araki, D.-T. Lin, Y. Yoshizawa, K. Higashi, A.-R. Park, D. Spiegelman, S. Dobrzyńska, A. Piton, H. Tomitori, H. Daoud, C. Massicotte, E. Henrion, O. Diallo, M. Shekarabi, C. Marineau, M. Shevell, B. Maranda, G. Mitchell, A. Nadeau, G. D’Anjou, M. Vanasse, M. Srour, R.G. Lafrenière, P. Drapeau, J.C. Lacaille, E. Kim, J.-R. Lee, K. Igarashi, R.L. Hagan, G.A. Rouleau, J.L. Michaud, Excess of De Novo Deleterious Mutations in Genes Associated with Glutamatergic Systems in Nonsyndromic Intellectual Disability, *Am. J. Hum. Genet.* 88 (2011) 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.001>.
- [31] R. Harripaul, A. Noor, M. Ayub, J.B. Vincent, The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026864>.
- [32] K. Schwarze, J. Buchanan, J.C. Taylor, S. Wordsworth, Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 20 (2018) 1122–1130. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.247>.
- [33] A. Stefanski, Y. Calle-López, C. Leu, E. Pérez-Palma, E. Pestana-Knight, D. Lal, Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: A systematic review and meta-analysis, *Epilepsia.* 62 (2021) 143–151. <https://doi.org/10.1111/epi.16755>.

- [34] D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D.G. Altman, PRISMA Group, Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, *PLoS Med.* 6 (2009) e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- [35] Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Zotero [Computer software]., (2021). <https://rrchnm.org/zotero/> (accessed October 17, 2021).
- [36] J. de Ligt, M.H. Willemsen, B.W.M. van Bon, T. Kleefstra, H.G. Yntema, T. Kroes, A.T. Vulto-van Silfhout, D.A. Koolen, P. de Vries, C. Gilissen, M. del Rosario, A. Hoischen, H. Scheffer, B.B.A. de Vries, H.G. Brunner, J.A. Veltman, L.E.L.M. Vissers, Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability, *N. Engl. J. Med.* 367 (2012) 1921–1929. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206524>.
- [37] M.H. Willemsen, T. Kleefstra, Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities., *Clin. Genet.* 85 (2014) 101–110. <https://doi.org/10.1111/cge.12244>.
- [38] P.F. Whiting, A.W.S. Rutjes, M.E. Westwood, S. Mallett, J.J. Deeks, J.B. Reitsma, M.M.G. Leeflang, J.A.C. Sterne, P.M.M. Bossuyt, QUADAS-2 Group, QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies, *Ann. Intern. Med.* 155 (2011) 529–536. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009>.
- [39] G. Schwarzer, J.R. Carpenter, G. Rücker, An Introduction to Meta-Analysis in R, in: G. Schwarzer, J.R. Carpenter, G. Rücker (Eds.), *Meta-Anal. R*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 3–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21416-0_1.

- [40] H. Wickham, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York, 2016. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- [41] G. Yu, L.-G. Wang, E. Hu, M. Chen, G. Dall'Olio, *clusterProfiler: A universal enrichment tool for interpreting omics data*, (2021). <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.clusterProfiler>.
- [42] K. Watanabe, E. Taskesen, A. van Bochoven, D. Posthuma, Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1826. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01261-5>.
- [43] R.K. Curtis, M. Oresic, A. Vidal-Puig, Pathways to the analysis of microarray data, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.05.011>.
- [44] H. Tipney, L. Hunter, An introduction to effective use of enrichment analysis software, *Hum. Genomics.* 4 (2010) 202. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-3-202>.
- [45] M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, G. Sherlock, Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat. Genet.* 25 (2000) 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>.
- [46] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [47] M. Al-Nabhani, S. Al-Rashdi, F. Al-Murshedi, A. Al-Kindi, K. Al-Thihli, A. Al-Saegh, A. Al-Futaisi, W. Al-Mamari, F. Zadjali, A. Al-Maawali, Reanalysis

- of exome sequencing data of intellectual disability samples: Yields and benefits., *Clin. Genet.* 94 (2018) 495–501. <https://doi.org/10.1111/cge.13438>.
- [48] T.-L. Le, L. Galmiche, J. Levy, P. Suwannarat, D.M. Hellebrekers, K. Morarach, F. Boismoreau, T.E. Theunissen, M. Lefebvre, A. Pelet, J. Martinovic, A. Gelot, F. Guimiot, A. Calleroz, C. Gitiaux, M. Hully, O. Goulet, C. Chardot, S. Drunat, Y. Capri, C. Bole-Feysot, P. Nitschke, S. Whalen, L. Mouthon, H.E. Babcock, R. Hofstra, I.F. de Coo, A.-C. Tabet, T.J. Molina, B. Keren, A.S. Brooks, H.J. Smeets, U. Marklund, C.T. Gordon, S. Lyonnet, J. Amiel, N. Bondurand, Dysregulation of the NRG1-ERBB pathway causes a developmental disorder with gastrointestinal dysmotility in humans., *J. Clin. Invest.* (2021). <https://doi.org/10.1172/JCI145837>.
- [49] N. Fieremans, H. Van Esch, M. Holvoet, G. Van Goethem, K. Devriendt, M. Rosello, S. Mayo, F. Martinez, S. Jhangiani, D.M. Muzny, R.A. Gibbs, J.R. Lupski, J.R. Vermeesch, P. Marynen, G. Froyen, Identification of Intellectual Disability Genes in Female Patients with a Skewed X-Inactivation Pattern, *Hum. Mutat.* 37 (2016) 804–811. <https://doi.org/10.1002/humu.23012>.
- [50] Broad Institute, GATK, (2022). <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us> (accessed April 21, 2022).
- [51] J. Xiang, Y. Ding, F. Yang, A. Gao, W. Zhang, H. Tang, J. Mao, Q. He, Q. Zhang, T. Wang, Genetic Analysis of Children With Unexplained Developmental Delay and/or Intellectual Disability by Whole-Exome Sequencing, *Front. Genet.* 12 (2021) 738561. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.738561>.

- [52] K.M. Bowling, M.L. Thompson, M.D. Amaral, C.R. Finnila, S.M. Hiatt, K.L. Engel, J.N. Cochran, K.B. Brothers, K.M. East, D.E. Gray, W.V. Kelley, N.E. Lamb, E.J. Lose, C.A. Rich, S. Simmons, J.S. Whittle, B.T. Weaver, A.S. Nesmith, R.M. Myers, G.S. Barsh, E.M. Bebin, G.M. Cooper, Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay., *Genome Med.* 9 (2017) 43. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0433-1>.
- [53] L.P. Bruno, G. Doddato, F. Valentino, M. Baldassarri, R. Tita, C. Fallerini, M. Bruttini, C. Lo Rizzo, M.A. Mencarelli, F. Mari, A.M. Pinto, F. Fava, A. Fabbiani, V. Lamacchia, A. Carrer, V. Caputo, S. Granata, E. Benetti, K. Zguro, S. Furini, A. Renieri, F. Ariani, New Candidates for Autism/Intellectual Disability Identified by Whole-Exome Sequencing, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 13439. <https://doi.org/10.3390/ijms222413439>.
- [54] W.-L. Charng, E. Karaca, Z. Coban Akdemir, T. Gambin, M.M. Atik, S. Gu, J.E. Posey, S.N. Jhangiani, D.M. Muzny, H. Doddapaneni, J. Hu, E. Boerwinkle, R.A. Gibbs, J.A. Rosenfeld, H. Cui, F. Xia, K. Manickam, Y. Yang, E.A. Faqeih, A. Al Asmari, M.A.M. Saleh, A.W. El-Hattab, J.R. Lupski, Exome sequencing in mostly consanguineous Arab families with neurologic disease provides a high potential molecular diagnosis rate., *BMC Med. Genomics.* 9 (2016) 42. <https://doi.org/10.1186/s12920-016-0208-3>.
- [55] J.-S. Chen, W.-H. Yu, M.-C. Tsai, P.-L. Hung, Y.-F. Tu, Comorbidities associated with genetic abnormalities in children with intellectual disability, *Sci. Rep.* 11 (2021) 6563. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86131-3>.

- [56] L.J. Ewans, D. Schofield, R. Shrestha, Y. Zhu, V. Gayevskiy, K. Ying, C. Walsh, E. Lee, E.P. Kirk, A. Colley, C. Ellaway, A. Turner, D. Mowat, L. Worgan, M.-L. Freckmann, M. Lipke, R. Sachdev, D. Miller, M. Field, M.E. Dinger, M.F. Buckley, M.J. Cowley, T. Roscioli, Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 20 (2018) 1564–1574. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.39>.
- [57] J. Halvardson, J.J. Zhao, A. Zaghlool, C. Wentzel, P. Georgii-Hemming, E. Mansson, H. Ederth Saevmarker, G. Brandberg, C. Soussi Zander, A.-C. Thuresson, L. Feuk, Mutations in HECW2 are associated with intellectual disability and epilepsy, *J. Med. Genet.* 53 (2016) 697–704. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103814>.
- [58] F.F. Hamdan, M. Srour, J.-M. Capo-Chichi, H. Daoud, C. Nassif, L. Patry, C. Massicotte, A. Ambalavanan, D. Spiegelman, O. Diallo, E. Henrion, A. Dionne-Laporte, A. Fougerat, A.V. Pshezhetsky, S. Venkateswaran, G.A. Rouleau, J.L. Michaud, De novo mutations in moderate or severe intellectual disability., *PLoS Genet.* 10 (2014) e1004772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004772>.
- [59] R. Harripaul, N. Vasli, A. Mikhailov, M.A. Rafiq, K. Mittal, C. Windpassinger, T.I. Sheikh, A. Noor, H. Mahmood, S. Downey, M. Johnson, K. Vleuten, L. Bell, M. Ilyas, F.S. Khan, V. Khan, M. Moradi, M. Ayaz, F. Naeem, A. Heidari, I. Ahmed, S. Ghadami, Z. Agha, S. Zeinali, R. Qamar, H. Mozhdhipanah, P. John, A. Mir, M. Ansar, L. French, M. Ayub, J.B. Vincent, Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in

- 192 consanguineous families., *Mol. Psychiatry*. 23 (2018) 973–984.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.60>.
- [60] T. Hiraide, K. Yamoto, Y. Masunaga, M. Asahina, Y. Endoh, Y. Ohkubo, T. Matsubayashi, S. Tsurui, H. Yamada, K. Yanagi, M. Nakashima, K. Hirano, H. Sugimura, T. Fukuda, T. Ogata, H. Saitsu, Genetic and phenotypic analysis of 101 patients with developmental delay or intellectual disability using whole-exome sequencing, *Clin. Genet*. 100 (2021) 40–50.
<https://doi.org/10.1111/cge.13951>.
- [61] H. Hu, K. Kahrizi, L. Musante, Z. Fattahi, R. Herwig, M. Hosseini, C. Oppitz, S.S. Abedini, V. Suckow, F. Larti, M. Beheshtian, B. Lipkowitz, T. Akhtarkhavari, S. Mehvari, S. Otto, M. Mohseni, S. Arzhang, P. Jamali, F. Mojahedi, M. Taghdiri, E. Papari, M.J. Soltani Banavandi, S. Akbari, S.H. Tonekaboni, H. Dehghani, M.R. Ebrahimpour, I. Bader, B. Davarnia, M. Cohen, H. Khodaei, B. Albrecht, S. Azimi, B. Zirn, M. Bastami, D. Wiczorek, G. Bahrami, K. Keleman, L.N. Vahid, A. Tzschach, J. Gärtner, G. Gillessen-Kaesbach, J.R. Varaghchi, B. Timmermann, F. Pourfatemi, A. Jankhah, W. Chen, P. Nikuei, V.M. Kalscheuer, M. Oladnabi, T.F. Wienker, H.-H. Ropers, H. Najmabadi, Genetics of intellectual disability in consanguineous families., *Mol. Psychiatry*. 24 (2019) 1027–1039.
<https://doi.org/10.1038/s41380-017-0012-2>.
- [62] I. Järvelä, T. Määttä, A. Acharya, J. Leppälä, S.N. Jhangiani, M. Arvio, A. Siren, M. Kankuri-Tammilehto, H. Kokkonen, M. Palomäki, T. Varilo, M. Fang, T.D. Hadley, A. Jolly, T. Linnankivi, R. Paetau, A. Saarela, R. Kälviäinen, J. Olme, L.M. Nouel-Saied, D.M. Cornejo-Sanchez, L. Llaci, J.R. Lupski, J.E. Posey, S.M. Leal, I. Schrauwen, Exome sequencing

- reveals predominantly de novo variants in disorders with intellectual disability (ID) in the founder population of Finland, *Hum. Genet.* 140 (2021) 1011–1029. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02268-1>.
- [63] K. Kahrizi, H. Hu, M. Hosseini, V.M. Kalscheuer, Z. Fattahi, M. Beheshtian, V. Suckow, M. Mohseni, B. Lipkowitz, S. Mehvari, Z. Mehrjoo, T. Akhtarkhavari, Z. Ghaderi, M. Rahimi, S. Arzhang, P. Jamali, M. Falahat Chian, P. Nikuei, F. Sabbagh Kermani, F. Sadeghinia, R. Jazayeri, S.H. Tonekaboni, A. Khoshaeen, H. Habibi, F. Pourfatemi, F. Mojahedi, M.-R. Khodaie-Ardakani, R. Najafipour, T.F. Wienker, H. Najmabadi, H.-H. Ropers, Effect of inbreeding on intellectual disability revisited by trio sequencing., *Clin. Genet.* 95 (2019) 151–159. <https://doi.org/10.1111/cge.13463>.
- [64] M. Kvarnung, F. Taylan, D. Nilsson, B.-M. Anderlid, H. Malmgren, K. Lagerstedt-Robinson, E. Holmberg, M. Burstedt, M. Nordenskjöld, A. Nordgren, E.S. Lundberg, Genomic screening in rare disorders: New mutations and phenotypes, highlighting ALG14 as a novel cause of severe intellectual disability., *Clin. Genet.* 94 (2018) 528–537. <https://doi.org/10.1111/cge.13448>.
- [65] J. Li, K. Gao, H. Yan, W. Xiangwei, N. Liu, T. Wang, H. Xu, Z. Lin, H. Xie, J. Wang, Y. Wu, Y. Jiang, Reanalysis of whole exome sequencing data in patients with epilepsy and intellectual disability/mental retardation., *Gene.* 700 (2019) 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.037>.
- [66] M. McSherry, K.E. Masih, N.H. Elcioglu, P. Celik, O. Balci, F.B. Cengiz, D. Nunez, C.J. Sineni, S. Seyhan, D. Kocaoglu, S. Guo, D. Duman, G. Bademci, M. Tekin, Identification of candidate gene FAM183A and novel

- pathogenic variants in known genes: High genetic heterogeneity for autosomal recessive intellectual disability., *PloS One*. 13 (2018) e0208324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208324>.
- [67] H. Megahed, M. Nicouleau, G. Barcia, D. Medina-Cano, K. Siquier-Pernet, C. Bole-Feysot, M. Parisot, C. Masson, P. Nitschké, M. Rio, N. Bahi-Buisson, I. Desguerre, A. Munnich, N. Boddaert, L. Colleaux, V. Cantagrel, Utility of whole exome sequencing for the early diagnosis of pediatric-onset cerebellar atrophy associated with developmental delay in an inbred population., *Orphanet J. Rare Dis.* 11 (2016) 57. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0436-9>.
- [68] G.R. Monroe, G.W. Frederix, S.M.C. Savelberg, T.I. de Vries, K.J. Duran, J.J. van der Smagt, P.A. Terhal, P.M. van Hasselt, H.Y. Kroes, N.M. Verhoeven-Duif, I.J. Nijman, E.C. Carbo, K.L. van Gassen, N.V. Knoers, A.M. Hövels, M.M. van Haelst, G. Visser, G. van Haften, Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional diagnostic trajectory in children with intellectual disability., *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 18 (2016) 949–956. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.200>.
- [69] N. Nouri, A. Bahreini, J. Nasiri, M. Salehi, Clinical and genetic profile of children with unexplained intellectual disability/developmental delay and epilepsy, *Epilepsy Res.* 177 (2021) 106782. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106782>.
- [70] E. Preikšaitienė, L. Ambrozaitytė, Ž. Maldžienė, A. Morkūnienė, L. Cimbalistienė, T. Rančelis, A. Utkus, V. Kučinskas, Identification of genetic causes of congenital neurodevelopmental disorders using genome wide

- molecular technologies., *Acta Medica Litu.* 23 (2016) 73–85.
<https://doi.org/10.6001/actamedica.v23i2.3324>.
- [71] A. Rauch, D. Wiczorek, E. Graf, T. Wieland, S. Endeke, T. Schwarzmayr, B. Albrecht, D. Bartholdi, J. Beygo, N. Di Donato, A. Dufke, K. Cremer, M. Hempel, D. Horn, J. Hoyer, P. Joset, A. Röpke, U. Moog, A. Riess, C.T. Thiel, A. Tzschach, A. Wiesener, E. Wohlleber, C. Zweier, A.B. Ekici, A.M. Zink, A. Rump, C. Meisinger, H. Grallert, H. Sticht, A. Schenck, H. Engels, G. Rappold, E. Schröck, P. Wieacker, O. Riess, T. Meitinger, A. Reis, T.M. Strom, Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: An exome sequencing study., *The Lancet.* 380 (2012) 1674–1682. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61480-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61480-9).
- [72] M.S. Reuter, H. Tawamie, R. Buchert, O. Hosny Gebril, T. Froukh, C. Thiel, S. Uebe, A.B. Ekici, M. Krumbiegel, C. Zweier, J. Hoyer, K. Eberlein, J. Bauer, U. Scheller, T.M. Strom, S. Hoffjan, E.R. Abdelraouf, N.A. Meguid, A. Abboud, M.A. Al Khateeb, M. Fakher, S. Hamdan, A. Ismael, S. Muhammad, E. Abdallah, H. Sticht, D. Wiczorek, A. Reis, R. Abou Jamra, Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders., *JAMA Psychiatry.* 74 (2017) 293–299.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.3798>.
- [73] S. Riazuddin, M. Hussain, A. Razzaq, Z. Iqbal, M. Shahzad, D.L. Polla, Y. Song, E. van Beusekom, A.A. Khan, L. Tomas-Roca, M. Rashid, M.Y. Zahoor, W.M. Wissink-Lindhout, M.A.R. Basra, M. Ansar, Z. Agha, K. van Heeswijk, F. Rasheed, M. Van de Vorst, J.A. Veltman, C. Gilissen, J. Akram, T. Kleefstra, M.Z. Assir, D. Grozeva, K. Carss, F.L. Raymond, T.D.

- O'Connor, S.A. Riazuddin, S.N. Khan, Z.M. Ahmed, A.P.M. de Brouwer, H. van Bokhoven, S. Riazuddin, Exome sequencing of Pakistani consanguineous families identifies 30 novel candidate genes for recessive intellectual disability., *Mol. Psychiatry.* 22 (2017) 1604–1614. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.109>.
- [74] P. Rump, O. Jazayeri, K.K. van Dijk-Bos, L.F. Johansson, A.J. van Essen, J.B.G.M. Verheij, H.E. Veenstra-Knol, E.J.W. Redeker, M.M.A.M. Mannens, M.A. Swertz, B.Z. Alizadeh, C.M.A. van Ravenswaaij-Arts, R.J. Sinke, B. Sikkema-Raddatz, Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly., *BMC Med. Genomics.* 9 (2016) 7. <https://doi.org/10.1186/s12920-016-0167-8>.
- [75] J.H.M. Schuurs-Hoeijmakers, A.T. Vulto-van Silfhout, L.E.L.M. Vissers, I.I.G.M. van de Vondervoort, B.W.M. van Bon, J. de Ligt, C. Gilissen, J.Y. Hehir-Kwa, K. Neveling, M. del Rosario, G. Hira, S. Reitano, A. Vitello, P. Failla, D. Greco, M. Fichera, O. Galesi, T. Kleefstra, M.T. Greally, C.W. Ockeloen, M.H. Willemsen, E.M.H.F. Bongers, I.M. Janssen, R. Pfundt, J.A. Veltman, C. Romano, M.A. Willemsen, H. van Bokhoven, H.G. Brunner, B.B.A. de Vries, A.P.M. de Brouwer, Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing., *J. Med. Genet.* 50 (2013) 802–811. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101644>.
- [76] F.M. Snoeijen-Schouwenaars, J.S. van Ool, J.S. Verhoeven, P. van Mierlo, H.M.H. Braakman, E.E. Smeets, J. Nicolai, J. Schoots, M.W.A. Teunissen, R.P.W. Rouhl, I.Y. Tan, H.G. Yntema, H.G. Brunner, R. Pfundt, A.P.

- Stegmann, E.-J. Kamsteeg, H.J. Schelhaas, M.H. Willemsen, Diagnostic exome sequencing in 100 consecutive patients with both epilepsy and intellectual disability., *Epilepsia*. 60 (2019) 155–164. <https://doi.org/10.1111/epi.14618>.
- [77] E.Z. Taşkıran, B. Karaosmanoğlu, C. Koşukcu, G. Ürel-Demir, Ö. Akgün-Doğan, P.Ö. Şimşek-Kiper, M. Alikışıfoğlu, K. Boduroğlu, G.E. Utine, Diagnostic yield of whole-exome sequencing in non-syndromic intellectual disability, *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR*. 65 (2021) 577–588. <https://doi.org/10.1111/jir.12835>.
- [78] F. Valentino, L.P. Bruno, G. Doddato, A. Giliberti, R. Tita, S. Resciniti, C. Fallerini, M. Bruttini, C. Lo Rizzo, M.A. Mencarelli, F. Mari, A.M. Pinto, F. Fava, M. Baldassarri, A. Fabbiani, V. Lamacchia, E. Benetti, K. Zguro, S. Furini, A. Renieri, F. Ariani, Exome Sequencing in 200 Intellectual Disability/Autistic Patients: New Candidates and Atypical Presentations, *Brain Sci*. 11 (2021) 936. <https://doi.org/10.3390/brainsci11070936>.
- [79] L.E.L.M. Vissers, J. de Ligt, C. Gilissen, I. Janssen, M. Steehouwer, P. de Vries, B. van Lier, P. Arts, N. Wieskamp, M. del Rosario, B.W.M. van Bon, A. Hoischen, B.B.A. de Vries, H.G. Brunner, J.A. Veltman, A de novo paradigm for mental retardation., *Nat. Genet*. 42 (2010) 1109–1112. <https://doi.org/10.1038/ng.712>.
- [80] B. Xiao, W. Qiu, X. Ji, X. Liu, Z. Huang, H. Liu, Y. Fan, Y. Xu, Y. Liu, H. Yie, W. Wei, H. Yan, Z. Gong, L. Shen, Y. Sun, Marked yield of re-evaluating phenotype and exome/target sequencing data in 33 individuals with intellectual disabilities., *Am. J. Med. Genet. A*. 176 (2018) 107–115. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38542>.

- [81] J.J. Zhao, J. Halvardson, C.S. Zander, A. Zaghlool, P. Georgii-Hemming, E. Månsson, G. Brandberg, H.E. Sävmarker, C. Frykholm, E. Kuchinskaya, A. Thuresson, L. Feuk, Exome sequencing reveals NAA15 and PUF60 as candidate genes associated with intellectual disability., *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 177 (2018) 10–20. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32574>.
- [82] B. Xiao, W. Qiu, X. Ji, X. Liu, Z. Huang, H. Liu, Y. Fan, Y. Xu, Y. Liu, H. Yie, W. Wei, H. Yan, Z. Gong, L. Shen, Y. Sun, Marked yield of re-evaluating phenotype and exome/target sequencing data in 33 individuals with intellectual disabilities, *Am. J. Med. Genet. A.* 176 (2018) 107–115. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38542>.
- [83] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 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, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 17 (2015) 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- [84] K. Wang, M. Li, H. Hakonarson, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>.
- [85] J. Thevenon, Y. Duffourd, A. Masurel-Paulet, M. Lefebvre, F. Feillet, S. El Chehadeh-Djebbar, J. St-Onge, A. Steinmetz, F. Huet, M. Chouchane, V. Darmency-Stamboul, P. Callier, C. Thauvin-Robinet, L. Faivre, J.B.

- Rivière, Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test., *Clin. Genet.* 89 (2016) 700–707. <https://doi.org/10.1111/cge.12732>.
- [86] S. Jacquemont, B.P. Coe, M. Hersch, M.H. Duyzend, N. Krumm, S. Bergmann, J.S. Beckmann, J.A. Rosenfeld, E.E. Eichler, A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders, *Am. J. Hum. Genet.* 94 (2014) 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.001>.
- [87] A. Piton, C. Redin, J.-L. Mandel, XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing, *Am. J. Hum. Genet.* 93 (2013) 368–383. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.013>.
- [88] T. Sarachana, M. Xu, R.-C. Wu, V.W. Hu, Sex hormones in autism: androgens and estrogens differentially and reciprocally regulate RORA, a novel candidate gene for autism, *PloS One.* 6 (2011) e17116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017116>.
- [89] T. Tukiainen, A.-C. Villani, A. Yen, M.A. Rivas, J.L. Marshall, R. Satija, M. Aguirre, L. Gauthier, M. Fleharty, A. Kirby, B.B. Cummings, S.E. Castel, K.J. Karczewski, F. Aguet, A. Byrnes, GTEx Consortium, Laboratory, Data Analysis & Coordinating Center (LDACC)—Analysis Working Group, Statistical Methods groups—Analysis Working Group, Enhancing GTEx (eGTEx) groups, NIH Common Fund, NIH/NCI, NIH/NHGRI, NIH/NIMH, NIH/NIDA, Biospecimen Collection Source Site—NDRI, Biospecimen Collection Source Site—RPCI, Biospecimen Core Resource—VARI, Brain Bank Repository—University of Miami Brain Endowment Bank, Leidos

- Biomedical—Project Management, ELSI Study, Genome Browser Data Integration & Visualization—EBI, Genome Browser Data Integration & Visualization—UCSC Genomics Institute, University of California Santa Cruz, T. Lappalainen, A. Regev, K.G. Ardlie, N. Hacohen, D.G. MacArthur, Landscape of X chromosome inactivation across human tissues, *Nature*. 550 (2017) 244–248. <https://doi.org/10.1038/nature24265>.
- [90] M. Al-Nabhani, S. Al-Rashdi, F. Al-Murshedi, A. Al-Kindi, K. Al-Thihli, A. Al-Saegh, A. Al-Futaisi, W. Al-Mamari, F. Zadjali, A. Al-Maawali, Reanalysis of exome sequencing data of intellectual disability samples: Yields and benefits, *Clin. Genet.* 94 (2018) 495–501. <https://doi.org/10.1111/cge.13438>.
- [91] F.J. Kaiser, M. Ansari, D. Braunholz, M. Concepción Gil-Rodríguez, C. Decroos, J.J. Wilde, C.T. Fincher, M. Kaur, M. Bando, D.J. Amor, P.S. Atwal, M. Bahlo, C.M. Bowman, J.J. Bradley, H.G. Brunner, D. Clark, M. Del Campo, N. Di Donato, P. Diakumis, H. Dubbs, D.A. Dymant, J. Eckhold, S. Ernst, J.C. Ferreira, L.J. Francey, U. Gehlken, E. Guillén-Navarro, Y. Gyftodimou, B.D. Hall, R. Hennekam, L. Hudgins, M. Hullings, J.M. Hunter, H. Yntema, A.M. Innes, A.D. Kline, Z. Krumina, H. Lee, K. Leppig, S.A. Lynch, M.B. Mallozzi, L. Mannini, S. McKee, S.G. Mehta, I. Micule, Care4Rare Canada Consortium, S. Mohammed, E. Moran, G.R. Mortier, J.-A.S. Moser, S.E. Noon, N. Nozaki, L. Nunes, J.G. Pappas, L.S. Penney, A. Pérez-Aytés, M.B. Petersen, B. Puisac, N. Revencu, E. Roeder, S. Saitta, A.E. Scheuerle, K.L. Schindeler, V.M. Siu, Z. Stark, S.P. Strom, H. Thiese, I. Vater, P. Willems, K. Williamson, L.C. Wilson, University of Washington Center for Mendelian Genomics, H. Hakonarson,

- F. Quintero-Rivera, J. Wierzba, A. Musio, G. Gillessen-Kaesbach, F.J. Ramos, L.G. Jackson, K. Shirahige, J. Pié, D.W. Christianson, I.D. Krantz, D.R. Fitzpatrick, M.A. Deardorff, Loss-of-function HDAC8 mutations cause a phenotypic spectrum of Cornelia de Lange syndrome-like features, ocular hypertelorism, large fontanelle and X-linked inheritance, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 2888–2900. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu002>.
- [92] L. Snijders Blok, E. Madsen, J. Juusola, C. Gilissen, D. Baralle, M.R.F. Reijnders, H. Venselaar, C. Helsmoortel, M.T. Cho, A. Hoischen, L.E.L.M. Vissers, T.S. Koemans, W. Wissink-Lindhout, E.E. Eichler, C. Romano, H. Van Esch, C. Stumpel, M. Vreeburg, E. Smeets, K. Oberndorff, B.W.M. van Bon, M. Shaw, J. Gecz, E. Haan, M. Bienek, C. Jensen, B.L. Loeys, A. Van Dijck, A.M. Innes, H. Racher, S. Vermeer, N. Di Donato, A. Rump, K. Tatton-Brown, M.J. Parker, A. Henderson, S.A. Lynch, A. Fryer, A. Ross, P. Vasudevan, U. Kini, R. Newbury-Ecob, K. Chandler, A. Male, DDD Study, S. Dijkstra, J. Schieving, J. Giltay, K.L.I. van Gassen, J. Schuurs-Hoeijmakers, P.L. Tan, I. Padiaditakis, S.A. Haas, K. Retterer, P. Reed, K.G. Monaghan, E. Haverfield, M. Natowicz, A. Myers, M.C. Kruer, Q. Stein, K.A. Strauss, K.W. Brigatti, K. Keating, B.K. Burton, K.H. Kim, J. Charrow, J. Norman, A. Foster-Barber, A.D. Kline, A. Kimball, E. Zackai, M. Harr, J. Fox, J. McLaughlin, K. Lindstrom, K.M. Haude, K. van Roozendaal, H. Brunner, W.K. Chung, R.F. Kooy, R. Pfundt, V. Kalscheuer, S.G. Mehta, N. Katsanis, T. Kleefstra, Mutations in DDX3X Are a Common Cause of Unexplained Intellectual Disability with Gender-Specific Effects on Wnt Signaling, *Am. J. Hum. Genet.* 97 (2015) 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.07.004>.

- [93] C.F. Wright, J.F. McRae, S. Clayton, G. Gallone, S. Aitken, T.W. FitzGerald, P. Jones, E. Prigmore, D. Rajan, J. Lord, A. Sifrim, R. Kellsell, M.J. Parker, J.C. Barrett, M.E. Hurles, D.R. FitzPatrick, H.V. Firth, Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders., *Genet Med.* 20 (2018) 1216–1223.
- [94] M. Fedurco, A. Romieu, S. Williams, I. Lawrence, G. Turcatti, BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e22. <https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>.
- [95] K. McKernan, A. Blanchard, L. Kotler, G. Costa, Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing, US20080003571A1, 2008. https://patents.google.com/patent/US20080003571/en/en_2 (accessed November 29, 2020).
- [96] J. Shendure, H. Ji, Next-generation DNA sequencing, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>.
- [97] J. Sampson, K. Jacobs, M. Yeager, S. Chanock, N. Chatterjee, Efficient study design for next generation sequencing, *Genet. Epidemiol.* 35 (2011) 269–277. <https://doi.org/10.1002/gepi.20575>.
- [98] R. D’Aurizio, R. Semeraro, A. Magi, Using XCAVATOR and EXCAVATOR2 to Identify CNVs from WGS, WES, and TS Data, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* (2018) e65. <https://doi.org/10.1002/cphg.65>.
- [99] C.A. Steward, A.P.J. Parker, B.A. Minassian, S.M. Sisodiya, A. Frankish, J. Harrow, Genome annotation for clinical genomic diagnostics: strengths

- and weaknesses, *Genome Med.* 9 (2017) 49. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0441-1>.
- [100] A. Papandreou, A. McTague, N. Trump, G. Ambegaonkar, A. Ngoh, E. Meyer, R.H. Scott, M.A. Kurian, GABRB3 mutations: a new and emerging cause of early infantile epileptic encephalopathy, *Dev. Med. Child Neurol.* 58 (2016) 416–420. <https://doi.org/10.1111/dmncn.12976>.
- [101] S. Mercimek-Mahmutoglu, J. Patel, D. Cordeiro, S. Hewson, D. Callen, E.J. Donner, C.D. Hahn, P. Kannu, J. Kobayashi, B.A. Minassian, M. Moharir, K. Siriwardena, S.K. Weiss, R. Weksberg, O.C. Snead, Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood, *Epilepsia.* 56 (2015) 707–716. <https://doi.org/10.1111/epi.12954>.
- [102] L.E.L.M. Vissers, C. Gilissen, J.A. Veltman, Genetic studies in intellectual disability and related disorders, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 9–18. <https://doi.org/10.1038/nrg3999>.
- [103] T. Froukh, O. Nafie, S.A.S. Al Hait, L. Laugwitz, J. Sommerfeld, M. Sturm, A. Baraghiti, T. Issa, A. Al-Nazer, P.A. Koch, J. Hanselmann, B. Kootz, P. Bauer, W. Al-Ameri, R. Abou Jamra, A.J. Alfrook, M. Hamadallah, L. Sofan, A. Riess, T.B. Haack, O. Riess, R. Buchert, Genetic basis of neurodevelopmental disorders in 103 Jordanian families., *Clin. Genet.* 97 (2020) 621–627. <https://doi.org/10.1111/cge.13720>.
- [104] F. Borlot, B.I. de Almeida, S.L. Combe, D.M. Andrade, F.M. Filloux, K.A. Myers, Clinical utility of multigene panel testing in adults with epilepsy and intellectual disability, *Epilepsia.* 60 (2019) 1661–1669. <https://doi.org/10.1111/epi.16273>.

- [105] A.M. Wenger, H. Guturu, J.A. Bernstein, G. Bejerano, Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 19 (2017) 209–214. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.88>.
- [106] T.S. Williams, K.P. McDonald, S.D. Roberts, N. Dlamini, G. deVeber, R. Westmacott, Prevalence and Predictors of Learning and Psychological Diagnoses Following Pediatric Arterial Ischemic Stroke, *Dev. Neuropsychol.* 42 (2017) 309–322. <https://doi.org/10.1080/87565641.2017.1353093>.
- [107] L.G. Biesecker, R.C. Green, Diagnostic clinical genome and exome sequencing, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 2418–2425. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1312543>.
- [108] E.A. Worthey, A.N. Mayer, G.D. Syverson, D. Helbling, B.B. Bonacci, B. Decker, J.M. Serpe, T. Dasu, M.R. Tschannen, R.L. Veith, M.J. Basehore, U. Broeckel, A. Tomita-Mitchell, M.J. Arca, J.T. Casper, D.A. Margolis, D.P. Bick, M.J. Hessner, J.M. Routes, J.W. Verbsky, H.J. Jacob, D.P. Dimmock, Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 13 (2011) 255–262. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182088158>.
- [109] S.M. Caspar, N. Dubacher, A.M. Kopps, J. Meienberg, C. Henggeler, G. Matyas, Clinical sequencing: From raw data to diagnosis with lifetime value, *Clin. Genet.* 93 (2018) 508–519. <https://doi.org/10.1111/cge.13190>.

- [110] T.G. Schulze, F.J. McMahon, Defining the phenotype in human genetic studies: forward genetics and reverse phenotyping, *Hum. Hered.* 58 (2004) 131–138. <https://doi.org/10.1159/000083539>.
- [111] A. Aledo-Serrano, R. Sánchez-Alcudia, R. Toledano, I. García-Morales, Á. Beltrán-Corbellini, I. del Pino, A. Gil-Nagel, Developmental and epileptic encephalopathies after negative or inconclusive genetic testing: what is next?, *J. Transl. Genet. Genomics.* 5 (2021) 443–455. <https://doi.org/10.20517/jtgg.2021.40>.
- [112] E. Isik, S. Yilmaz, T. Atik, G. Aktan, H. Onay, S. Gokben, F. Ozkinay, The utility of whole exome sequencing for identification of the molecular etiology in autosomal recessive developmental and epileptic encephalopathies, *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 41 (2020) 3729–3739. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04619-8>.
- [113] L. Musante, P. Costa, C. Zanusi, F. Faletra, F.M. Murru, A.M. Bianco, M. La Bianca, G. Ragusa, E. Athanasakis, A.P. d’Adamo, M. Carrozzi, P. Gasparini, The Genetic Diagnosis of Ultrarare DEEs: An Ongoing Challenge, *Genes.* 13 (2022) 500. <https://doi.org/10.3390/genes13030500>.
- [114] M. Zhao, Y.-J. Chen, M.-W. Wang, X.-H. Lin, E.-L. Dong, W.-J. Chen, N. Wang, X. Lin, Genetic and Clinical Profile of Chinese Patients with Autosomal Dominant Spastic Paraplegia., *Mol. Diagn. Ther.* 23 (2019) 781–789. <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00426-w>.
- [115] N. Sobreira, F. Schiettecatte, D. Valle, A. Hamosh, GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same

- gene, *Hum. Mutat.* 36 (2015) 928–930.
<https://doi.org/10.1002/humu.22844>.
- [116] A. Hamosh, E. Wohler, R. Martin, S. Griffith, E. da S. Rodrigues, C. Antonescu, K.F. Doheny, D. Valle, N. Sobreira, The impact of GeneMatcher on international data sharing and collaboration, *Hum. Mutat.* 43 (2022) 668–673. <https://doi.org/10.1002/humu.24350>.
- [117] S. Chokron, K. Kovarski, T. Zalla, G.N. Dutton, The inter-relationships between cerebral visual impairment, autism and intellectual disability, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 114 (2020) 201–210.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.008>.
- [118] A. De Giorgio, The roles of motor activity and environmental enrichment in intellectual disability, *Somatosens. Mot. Res.* 34 (2017) 34–43.
<https://doi.org/10.1080/08990220.2016.1278204>.
- [119] C.S. Leblond, T.-L. Le, S. Malesys, F. Cliquet, A.-C. Tabet, R. Delorme, T. Rolland, T. Bourgeron, Operative list of genes associated with autism and neurodevelopmental disorders based on database review, *Mol. Cell. Neurosci.* 113 (2021) 103623. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103623>.
- [120] K.A. Phillips, M.P. Douglas, S. Wordsworth, J. Buchanan, D.A. Marshall, Availability and funding of clinical genomic sequencing globally, *BMJ Glob. Health.* 6 (2021) e004415. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-004415>.
- [121] J.J. Day, J.D. Sweatt, Epigenetic mechanisms in cognition, *Neuron.* 70 (2011) 813–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>.
- [122] G.E. Zentner, P.C. Scacheri, The chromatin fingerprint of gene enhancer elements, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 30888–30896.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R111.296491>.

- [123] R.E. Amir, I.B. Van den Veyver, M. Wan, C.Q. Tran, U. Francke, H.Y. Zoghbi, Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2, *Nat. Genet.* 23 (1999) 185–188. <https://doi.org/10.1038/13810>.
- [124] S. Iwase, N.G. Bérubé, Z. Zhou, N.N. Kasri, E. Battaglioli, M. Scandaglia, A. Barco, Epigenetic Etiology of Intellectual Disability, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37 (2017) 10773–10782. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1840-17.2017>.
- [125] H. van Bokhoven, Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities, *Annu. Rev. Genet.* 45 (2011) 81–104. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132512>.
- [126] M. Scandaglia, J.P. Lopez-Atalaya, A. Medrano-Fernandez, M.T. Lopez-Cascales, B. Del Blanco, M. Lipinski, E. Benito, R. Olivares, S. Iwase, Y. Shi, A. Barco, Loss of Kdm5c Causes Spurious Transcription and Prevents the Fine-Tuning of Activity-Regulated Enhancers in Neurons, *Cell Rep.* 21 (2017) 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.014>.
- [127] H. Shen, W. Xu, R. Guo, B. Rong, L. Gu, Z. Wang, C. He, L. Zheng, X. Hu, Z. Hu, Z.-M. Shao, P. Yang, F. Wu, Y.G. Shi, Y. Shi, F. Lan, Suppression of Enhancer Overactivation by a RACK7-Histone Demethylase Complex, *Cell.* 165 (2016) 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.064>.
- [128] E.A. Heller, H.M. Cates, C.J. Peña, H. Sun, N. Shao, J. Feng, S.A. Golden, J.P. Herman, J.J. Walsh, M. Mazei-Robison, D. Ferguson, S. Knight, M.A. Gerber, C. Nievera, M.-H. Han, S.J. Russo, C.S. Tamminga, R.L. Neve, L. Shen, H.S. Zhang, F. Zhang, E.J. Nestler, Locus-Specific Epigenetic Remodeling Controls Addiction- and Depression-Related Behaviors (NN-

- A50213-T), *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 1720–1727. <https://doi.org/10.1038/nn.3871>.
- [129] F. Rusconi, B. Grillo, L. Ponzoni, S. Bassani, E. Toffolo, L. Paganini, A. Mallei, D. Braidà, M. Passafaro, M. Popoli, M. Sala, E. Battaglioli, LSD1 modulates stress-evoked transcription of immediate early genes and emotional behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 3651–3656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511974113>.
- [130] W.M. Webb, R.G. Sanchez, G. Perez, A.A. Butler, R.M. Hauser, M.C. Rich, A.L. O’Bierne, T.J. Jarome, F.D. Lubin, Dynamic association of epigenetic H3K4me3 and DNA 5hmC marks in the dorsal hippocampus and anterior cingulate cortex following reactivation of a fear memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* 142 (2017) 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.010>.
- [131] L. Poeta, A. Padula, B. Attianese, M. Valentino, L. Verrillo, S. Filosa, C. Shoubridge, A. Barra, C.E. Schwartz, J. Christensen, H. van Bokhoven, K. Helin, M.B. Lioi, P. Collombat, J. Gecz, L. Altucci, E. Di Schiavi, M.G. Miano, Histone demethylase KDM5C is a SAHA-sensitive central hub at the crossroads of transcriptional axes involved in multiple neurodevelopmental disorders, *Hum. Mol. Genet.* 28 (2019) 4089–4102. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz254>.
- [132] K.S. Kosik, The neuronal microRNA system, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 911–920. <https://doi.org/10.1038/nrn2037>.
- [133] S. Martino, I. di Girolamo, A. Orlacchio, A. Datti, A. Orlacchio, MicroRNA implications across neurodevelopment and neuropathology, *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 654346. <https://doi.org/10.1155/2009/654346>.

- [134] N.J. Beveridge, M.J. Cairns, MicroRNA dysregulation in schizophrenia, *Neurobiol. Dis.* 46 (2012) 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.029>.
- [135] H.-I. Im, P.J. Kenny, MicroRNAs in neuronal function and dysfunction, *Trends Neurosci.* 35 (2012) 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.004>.
- [136] C. Leucht, C. Stigloher, A. Wizenmann, R. Klafke, A. Folchert, L. Bally-Cuif, MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary, *Nat. Neurosci.* 11 (2008) 641–648. <https://doi.org/10.1038/nn.2115>.
- [137] M. Shibata, D. Kurokawa, H. Nakao, T. Ohmura, S. Aizawa, MicroRNA-9 Modulates Cajal–Retzius Cell Differentiation by Suppressing Foxg1 Expression in Mouse Medial Pallium, *J. Neurosci.* 28 (2008) 10415–10421. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3219-08.2008>.
- [138] M. Shibata, H. Nakao, H. Kiyonari, T. Abe, S. Aizawa, MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31 (2011) 3407–3422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5085-10.2011>.
- [139] R. Madelaine, S.A. Sloan, N. Huber, J.H. Notwell, L.C. Leung, G. Skariah, C. Halluin, S.P. Paşca, G. Bejerano, M.A. Krasnow, B.A. Barres, P. Mourrain, MicroRNA-9 Couples Brain Neurogenesis and Angiogenesis, *Cell Rep.* 20 (2017) 1533–1542. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.051>.
- [140] D. Edbauer, J.R. Neilson, K.A. Foster, C.-F. Wang, D.P. Seeburg, M.N. Batterton, T. Tada, B.M. Dolan, P.A. Sharp, M. Sheng, Regulation of

- synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132, *Neuron*. 65 (2010) 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.005>.
- [141] T. Horai, S. Boku, S. Okazaki, I. Otsuka, W. Ratta-Apha, K. Mouri, N. Yamaki, T. Hirata, A. Hishimoto, miR-19b is elevated in peripheral blood of schizophrenic patients and attenuates proliferation of hippocampal neural progenitor cells, *J. Psychiatr. Res.* 131 (2020) 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.09.006>.
- [142] K. Miyake, T. Hirasawa, T. Koide, T. Kubota, Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases, *Adv. Exp. Med. Biol.* 724 (2012) 91–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_7.
- [143] R. Didden, J. Sigafos, A review of the nature and treatment of sleep disorders in individuals with developmental disabilities, *Res. Dev. Disabil.* 22 (2001) 255–272. [https://doi.org/10.1016/s0891-4222\(01\)00071-3](https://doi.org/10.1016/s0891-4222(01)00071-3).
- [144] M. Mirmiran, Y.G.H. Maas, R.L. Ariagno, Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms, *Sleep Med. Rev.* 7 (2003) 321–334. <https://doi.org/10.1053/smr.2002.0243>.
- [145] K. Spruyt, L.M.G. Curfs, Non-pharmacological management of problematic sleeping in children with developmental disabilities, *Dev. Med. Child Neurol.* 57 (2015) 120–136. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12623>.
- [146] M. Fatima, S. Srivastav, A.C. Mondal, Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates, *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 60 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.04.001>.

- [147] M.E. Pallarés, M.C. Antonelli, Prenatal Stress and Neurodevelopmental Plasticity: Relevance to Psychopathology, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1015 (2017) 117–129. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_7.
- [148] A. Leavy, E.M. Jimenez Mateos, Perinatal Brain Injury and Inflammation: Lessons from Experimental Murine Models, *Cells*. 9 (2020) E2640. <https://doi.org/10.3390/cells9122640>.
- [149] I. Paine, J.E. Posey, C.M. Grochowski, S.N. Jhangiani, S. Rosenheck, R. Kleyner, T. Marmorale, M. Yoon, K. Wang, R. Robison, G. Cappuccio, M. Pinelli, A. Magli, Z. Coban Akdemir, J. Hui, W.L. Yeung, B.K.Y. Wong, L. Ortega, M.R. Bekheirnia, T. Bierhals, M. Hempel, J. Johannsen, R. Santer, D. Aktas, M. Alikasifoglu, S. Bozdogan, H. Aydin, E. Karaca, Y. Bayram, H. Ityel, M. Dorschner, J.J. White, E. Wilichowski, S.B. Wortmann, E.B. Casella, J.P. Kitajima, F. Kok, F. Monteiro, D.M. Muzny, M. Bamshad, R.A. Gibbs, V.R. Sutton, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, Telethon Undiagnosed Diseases Program, H. Van Esch, N. Brunetti-Pierri, F. Hildebrandt, A. Brautbar, I.B. Van den Veyver, I. Glass, D. Lessel, G.J. Lyon, J.R. Lupski, Paralog Studies Augment Gene Discovery: DDX and DHX Genes, *Am. J. Hum. Genet.* 105 (2019) 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.06.001>.
- [150] D. Vancampfort, F. Schuch, T. Van Damme, J. Firth, S. Suetani, B. Stubbs, D. Van Biesen, Prevalence of diabetes in people with intellectual disabilities and age- and gender-matched controls: A meta-analysis, *J. Appl. Res. Intellect. Disabil. JARID.* 35 (2022) 301–311. <https://doi.org/10.1111/jar.12949>.

- [151] V. Okur, M.T. Cho, R. van Wijk, B. van Oirschot, J. Picker, S.A. Coury, D. Grange, L. Manwaring, I. Krantz, C.C. Muraresku, P.J. Hulick, H. May, E. Pierce, E. Place, K. Bujakowska, A. Telegrafi, G. Douglas, K.G. Monaghan, A. Begtrup, A. Wilson, K. Retterer, K. Anyane-Yeboah, W.K. Chung, De novo variants in HK1 associated with neurodevelopmental abnormalities and visual impairment, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*. 27 (2019) 1081–1089. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0366-9>.
- [152] M. Cuypers, B.W.M. Schalk, A.J.N. Boonman, J. Naaldenberg, G.L. Leusink, Cancer-related mortality among people with intellectual disabilities: A nationwide population-based cohort study, *Cancer*. 128 (2022) 1267–1274. <https://doi.org/10.1002/cncr.34030>.
- [153] P. Liao, C. Vajdic, J. Trollor, S. Reppermund, Prevalence and incidence of physical health conditions in people with intellectual disability - a systematic review, *PloS One*. 16 (2021) e0256294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256294>.
- [154] S. Reppermund, P. Srasuebku, K. Dean, J.N. Trollor, Factors associated with death in people with intellectual disability, *J. Appl. Res. Intellect. Disabil. JARID*. 33 (2020) 420–429. <https://doi.org/10.1111/jar.12684>.
- [155] C. Cosarderelioglu, L.S. Nidadavolu, C.J. George, E.S. Oh, D.A. Bennett, J.D. Walston, P.M. Abadir, Brain Renin–Angiotensin System at the Intersect of Physical and Cognitive Frailty, *Front. Neurosci*. 14 (2020). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2020.586314> (accessed April 5, 2022).
- [156] P.M. Abadir, The frail renin-angiotensin system, *Clin. Geriatr. Med*. 27 (2011) 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.08.004>.

- [157] S.J. Forrester, G.W. Booz, C.D. Sigmund, T.M. Coffman, T. Kawai, V. Rizzo, R. Scalia, S. Eguchi, Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology, *Physiol. Rev.* 98 (2018) 1627–1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>.
- [158] J.L. Labandeira-Garcia, A.I. Rodríguez-Perez, P. Garrido-Gil, J. Rodríguez-Pallares, J.L. Lanciego, M.J. Guerra, Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration, *Front. Aging Neurosci.* 9 (2017) 129. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129>.
- [159] Y.V. Gowrisankar, M.A. Clark, Angiotensin II regulation of angiotensin-converting enzymes in spontaneously hypertensive rat primary astrocyte cultures, *J. Neurochem.* 138 (2016) 74–85. <https://doi.org/10.1111/jnc.13641>.
- [160] A.M. Baig, A. Khaleeq, U. Ali, H. Syeda, Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms, *ACS Chem. Neurosci.* 11 (2020) 995–998. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00122>.
- [161] M. Karnik, N.M. Beeraka, C.A. Uthaiyah, S.M. Nataraj, A.D.S. Bettadapura, G. Aliev, S.V. Madhunapantula, A Review on SARS-CoV-2-Induced Neuroinflammation, Neurodevelopmental Complications, and Recent Updates on the Vaccine Development, *Mol. Neurobiol.* 58 (2021) 4535–4563. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02399-6>.
- [162] S.C. Borrie, H. Brems, E. Legius, C. Bagni, Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities: The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-

AKT-mTOR Pathways, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 18 (2017) 115–142. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035332>.

Figures:

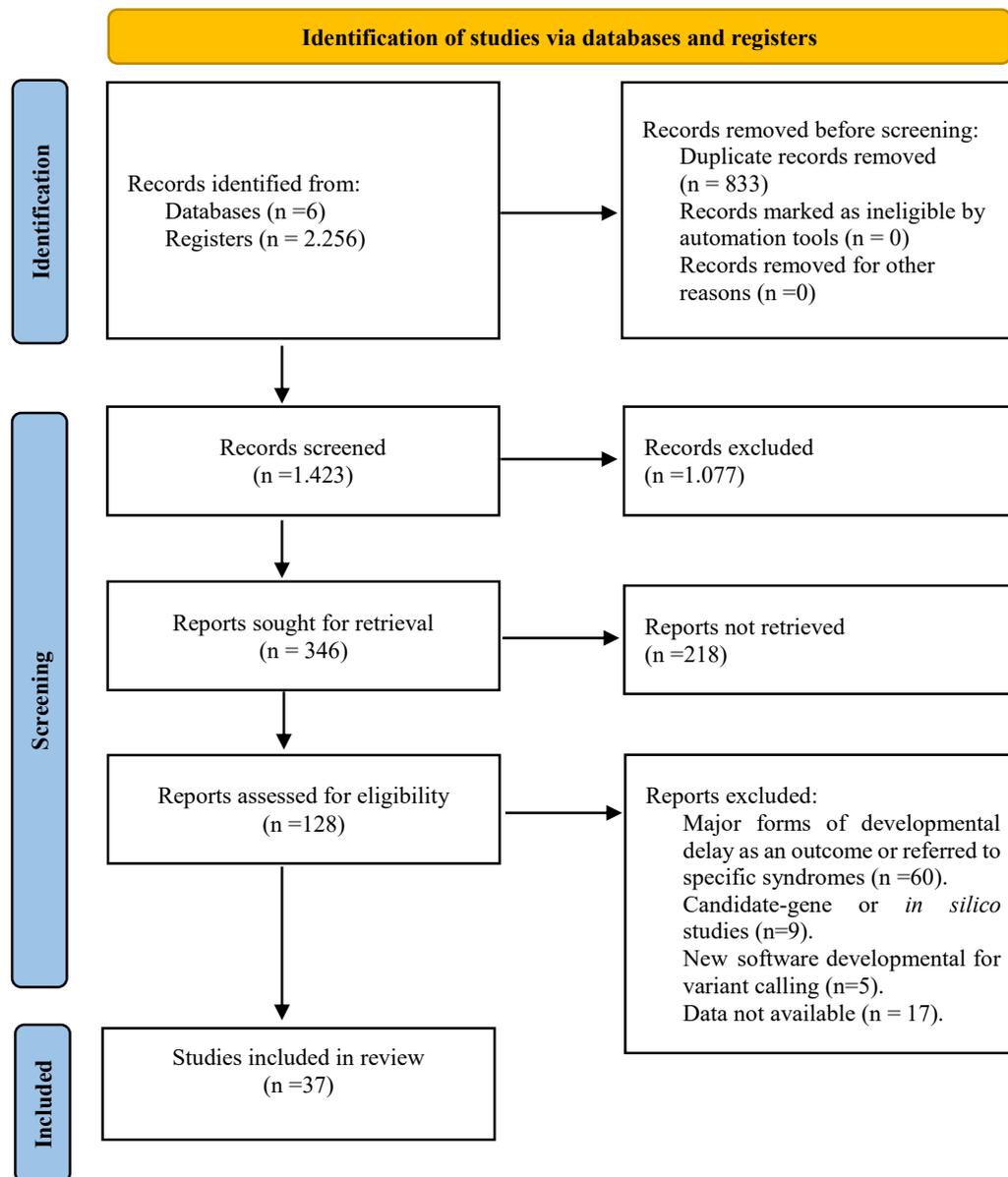


Figure 1. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) flowchart of scoping review article inclusion.

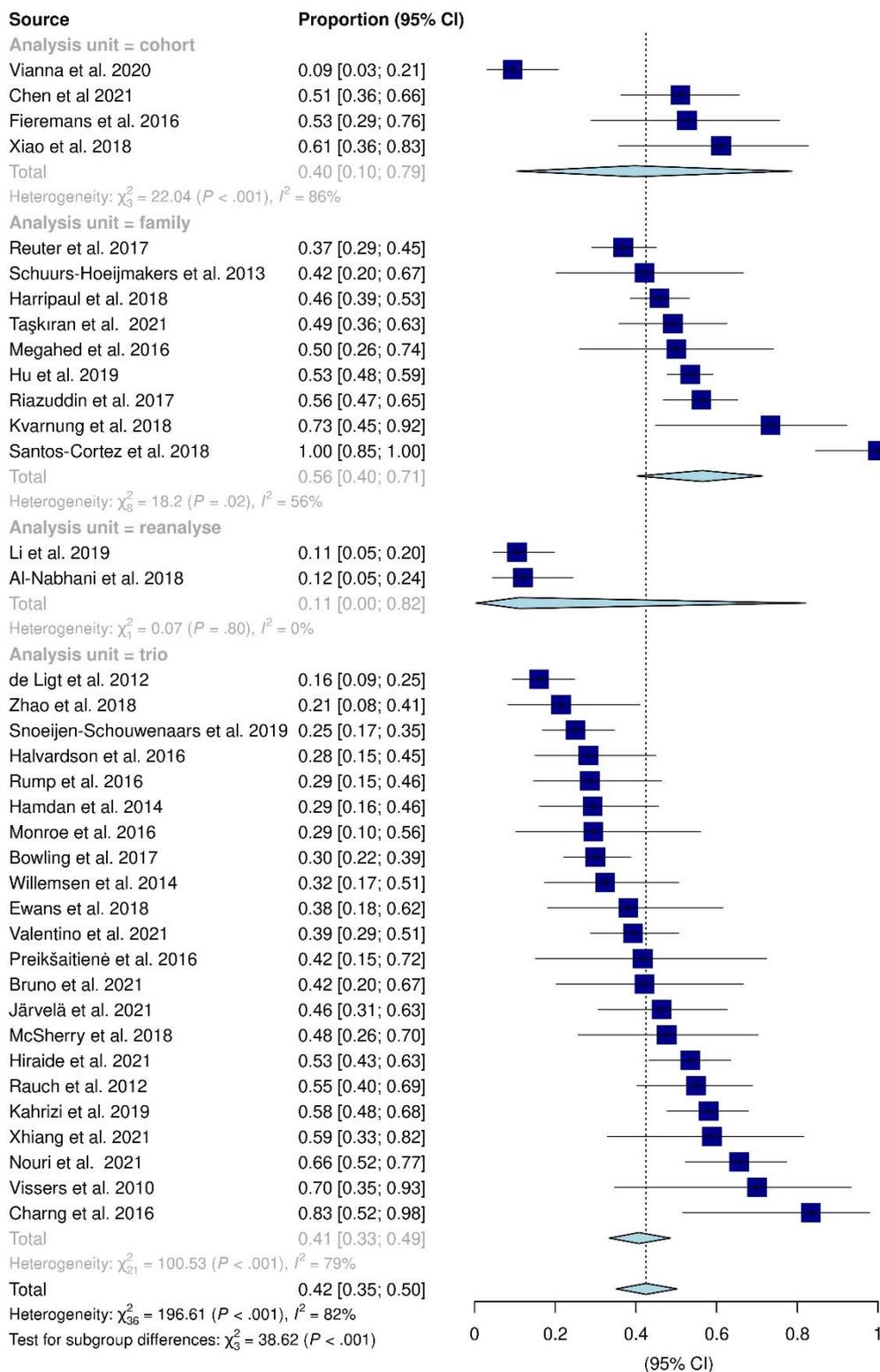


Figure 2. Forest plot of random-effects meta-regression to estimate WES molecular diagnostic yield (including de novo and inherited mutations) of full sample (n patients positive/ n patients total) and stratified/grouped by unit of analysis (i.e., family, cohort, trio, and reanalysis). Confidence interval [CI]. $n = 37$ articles included.

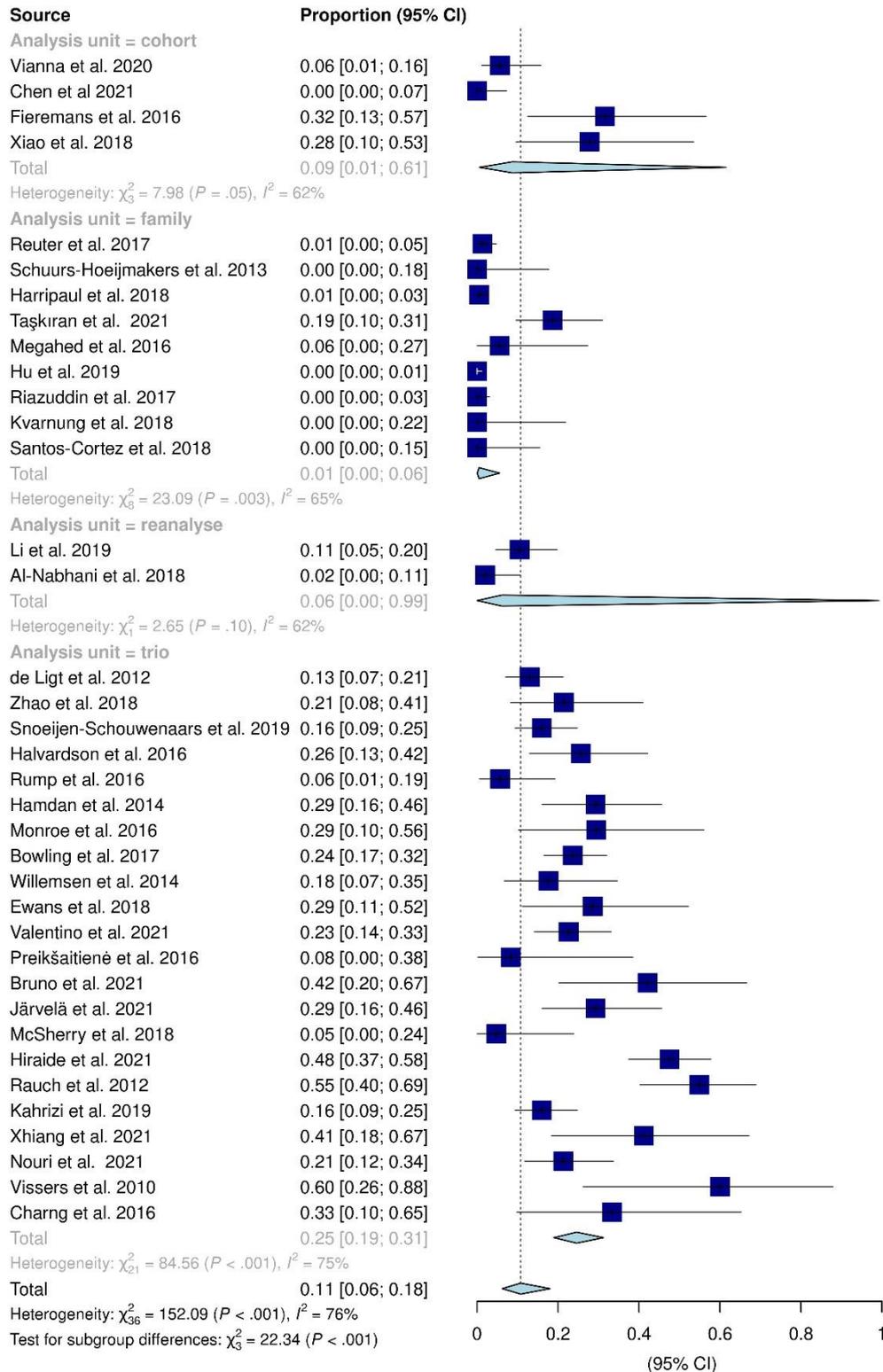


Figure 3. Forest plot of random-effects meta-regression to specifically estimate WES de novo mutation (n positive-DNMs/n total) molecular diagnostic yield of full sample, and in subgroups, according to unit of analysis (i.e., family, cohort, trio, and reanalysis). Confidence interval [CI]. n = 37 articles included.

Tables:**Table 1:** Summary of general, demographic, clinical, and technical characteristics of studies included in the systematic review (N=37).

Characteristics	Number of studies	(%)
Year of publication		
2016-2021	31	83,78
2010-2015	6	16,22
Continental origin of sample		
Europe	16	43,24
Asia	16	43,24
North America	2	5,41
Oceania	1	2,7
Africa	1	2,7
South America	1	2,7
Sample size (number of ID probands) n total=2252		
10-25	14	37,84
26-100	17	45,95
101-318	6	16,22
Age groups		
All ages	17	45,95
Under 18 years old	6	16,22
Not reported/unclear	14	37,84
Sex proportion		
Predominantly males	13	35,14
Predominantly females	7	18,92
No reported/unclear	17	45,95
Presence of Consanguinity*		
Yes (in any degree)	19	54,29
No	8	22,86
No reported/unclear	8	22,86
Study analytical design unit		
Trio	22	59,46
Family	9	24,32
Cohort	4	10,81
Reanalysis	2	5,41
WES used as first line		
No	32	86,49
Yes	1	2,7

	Not reported/unclear	4	10,81
IQ measurement method *			
	Validated instrument	11	31,43
	Milestone	4	11,43
	Not reported/unclear	20	57,14
Sequencing platform	Ilumina	25	67,57
	SOLID	7	18,92
	Mixed	3	8,11
	Other	2	5,41
Pipeline for variants calling			
	GATK	16	43,24
	Custom bioinformatic analysis pipeline	12	32,43
	Others	5	13,51
	GATK + another	3	8,11
	Not reported/unclear	1	2,7
Standard classification (ACMG)			
	Yes	21	56,76
	No	15	40,54
	Not reported/unclear	1	2,7
Mutation confirmation through Sanger sequencing*			
	Yes	31	88,57
CNV analysis from WES data	No	4	11,43
Pipeline for CNVs calling			
	Yes	11	29,73
	No	26	70,27
Detected and reported CNVs			
	Yes	6	16,22
	No	31	83,78
CNVs confirmation (**)			
	Yes	6	16,22
	No	31	83,78

* N=35, the 2 studies based on data sets were excluded for these categories. Genome Analysis Toolkit (GATK). American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Intelligence quotient (IQ).

** Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or quantitative PCR (qPCR) or CNV sequencing (CNV-seq).

Table 2: General, demographic, clinical, technical, and quality evaluation characteristics of studies included in the systematic review (N=37).

Reference	Descriptive characteristics of the studies	QUADAS-2 Domains		
		Patient selection	Index test	Reference standard
Al-Nabhani et al. 2018	This study evaluated dataset from Oman (n=50), using the Illumina platform. BCFtools/ANNOVAR tools were used for variants calling. Its results were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 12.00%.	high	low	low
Bowling et al. 2017	This study evaluated trios from USA (n=127). Individuals of several ages were included and IQ was assessed using validated instrument. Illumina platform was used for sequencing and GATK/Burrows-Wheeler Alignment tool (BWA) was used for variants calling. Its results were confirmed by Sanger sequencing and were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 29.92 %	low	low	low
Bruno et al. 2021	This study evaluated trios (n=19) from Italy. Individuals of several years were included. Illumina platform was used for sequencing. Custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling. Its results were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 42.1 %	unclear	low	low
Charng et al. 2016	This study evaluated trios from Saudi Arabia (n=12), using the Illumina platform. The variants calling was based on HGSC Mercury analysis pipeline. Its results were confirmed through Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 83.33%	unclear	low	low

Chen et al. 2021	This study evaluated a cohort (n=49) from China. Individuals under 18 years old were included and IQ assessment was done through validated instrument. Illumina platform was used for sequencing. Custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling. Its results were confirmed by Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 51 %	low	low	low
de Ligt et al. 2012	This study evaluated trios from The Netherlands (n=100). Individuals of several ages were included and IQ was assessed using validated instrument. SOLID platform was used for sequencing, and the variants calling was based on SOLiD Small InDel Tool. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 16.00%	low	low	low
Ewans et al. 2018	This study evaluated trios from Australia (n=21), using the Illumina platform for sequencing. The variants calling was done through GATK. The results were confirmed using Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG). The reported diagnostic rate was of 38.10%	low	low	low
Fieremans et al. 2016	This study evaluated a cohort from France (n=19). It included only females of several ages and used Illumina platform for sequencing. Variants calling was done using GATK. The results were confirmed through Sanger methodology. The reported diagnostic rate was of 52.63%	unclear	low	low
Halvardson et al. 2016	This study evaluated trios from Sweden (n=39), using SOLiD, Illumina and Thermo Fisher platforms. The pipeline for variants calling was GATK. The results were confirmed through Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG). The diagnostic rate was of 28.21 %	low	unclear	low

Hamdan et al. 2014	This study evaluated trios from Vancouver (n=41), Canada. Individuals of several ages were included. It used the Illumina platform for sequencing. The pipeline for variants calling was GATK and the results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 29.27 %	low	low	low
Harripaul et al. 2018	This study evaluated families from Pakistan/Iran (n=192), using SOLID platform for sequencing. The pipeline for variants calling was GATK/BWA-mem. The results were confirmed using Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 45.83%.	low	low	low
Hiraide et al. 2021	This study evaluated trios (n=101) from Japon, individuals of several ages were included and IQ assessment was by valid instrument. Used the Illumina platform, the pipeline for calling variables was GATK. CNVs were reported from the WES data. Its results were confirmed by Sanger methodology and reported according /to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 53.5 %	low	low	low
Hu et al. 2019	This study evaluated families from Iran (n=318), using Illumina platform for sequencing. The pipeline for variants calling was MERAP. CNVs were reported from the WES data. The results were confirmed by Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG). The reported diagnostic rate was of 53.46%.	low	low	low
Järvelä et al. 2021	This study evaluated trios from Syria and Finland (n=41), individuals of several ages were included. Illumina platform was used for sequencing. The pipeline used for variants calling was GATK. The results were confirmed through Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG). The reported diagnostic rate was of 46.34 %	low	low	low

Kahrizi et al. 2019	This study evaluated trios from Iran (n=100). Individual IQ was assessed using validated instrument. Illumina platform was used for sequencing. The pipeline used for variants calling was MERAP. The results were reported according to the Standard classification (ACMG). The reported diagnostic rate was of 58.00%	low	low	low
Kvarnung et al. 2018	This study evaluated families from Sweden (n=15), using the Illumina platform for sequencing. Variants calling was done through GATK. CNVs were reported from the WES data. The results were confirmed using Sanger methodology The reported diagnostic rate was of 73.33%.	low	low	low
Li et al. 2019	This study evaluated dataset from Pekin/China (n=76), including individuals under 18 years of age. Illumina platform was used fir sequencing. Variants calling was done through GATK. The results were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 10.53%.	high	low	low
McSherry et al. 2018	This study evaluated trios from Turkey (n=21), and included individuals of several ages. Illumina platform was used for sequencing and custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 47.62 %	low	low	low
Megahed et al. 2016	This study evaluated families from Cairo, Egypt (n=18), and individuals of several ages were included. Illumina platform was used for sequencing and GATK was used for variants calling. The results were confirmed using Sanger methodology. The reported diagnostic rate was of 50.00%.	low	low	low

Monroe et al. 2016	This study evaluated trios from The Netherlands (n=17), using the Illumina platform for sequencing and a custom bioinformatic analysis pipeline for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 29.41%	low	unclear	low
Nouri et al. 2021	This study evaluated trios (n=61) from Iran. Individuals under 18 years old were included. Illumina platform was used for sequencing and a custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling. CNVs were reported from the WES data. Its results were confirmed by Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 65.6%	low	low	low
Preikšaitienė et al. 2016	This study evaluated trios from Lithuanian individuals (n=12) of several ages. SOLID platform was used for sequencing and GATK was used for variants calling. The results confirmation was not reported. The reported diagnostic rate was of 41.67 %	low	low	low
Rauch et al. 2012	This study evaluated trios from Germany/ Switzerland (n=51). IQ was assessed using validated instrument. Illumina platform was used for sequencing and a custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling. The results were confirmed using Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 54.90 %	low	unclear	low
Reuter et al. 2017	This study evaluated families (n=152) from Syria (46.7%), Turkey (22.4%), Egypt (12.5%), Jordan (4.6%), and from other countries (13.8%). Individuals of several ages were included and IQ was assessed using validated instrument. SOLID and Illumina platforms were used for sequencing and a custom bioinformatic pipeline was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 36.84 %	low	high	low

Riazuddin et al. 2017	This study evaluated families from Pakistan (n=121). IQ assessment was classified as milestone. SOLID platform was used for sequencing and custom bioinformatic pipeline was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 56.20%.	unclear	unclear	low
Rump et al. 2016	This study evaluated trios (n=35) from The Netherlands and included individuals of several ages. Illumina platform was used for sequencing and GATK was used for variants calling. The results were confirmed using Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 28.57 %	low	low	low
Santos-Cortez et al. 2018	This study evaluated families (n=22) from Pakistan, and included individuals of several ages. Illumina platform was used for sequencing. GATK was used for variants calling. The results were confirmed using Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 100.00%.	unclear	low	low
Schuurs-Hoeijmakers et al. 2013	This study evaluated families (n=19) from The Netherlands, using the SOLID platform for sequencing. A custom bioinformatics pipeline was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 42.11%.	unclear	unclear	low
Snoeijen-Schouwenaars et al. 2019	This study evaluated trios (n=100) from The Netherlands, and included individuals of several ages. IQ was assessed using validated instrument. Life Technologies platform was used for sequencing, and a custom bioinformatic pipeline was used for variants calling. CNVs reported from the WES data. The results were confirmed through Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 25.00%	low	unclear	low

Taşkıran et al. 2021		This study evaluated trio (n=59) from Turkey. Individuals of several ages were included and IQ assessment was done using validated instrument. Thermo Fisher platform was used for sequencing and a custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling. The results were confirmed by Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 49.2 %	low	low	low
Valentino et al. 2021		This study evaluated trio (n=84) from Italy. Individuals of several ages were included. Thermo Fisher platform was used for sequencing and a custom bioinformatic analysis pipeline was used for variants calling, obtaining a diagnostic rate of 39.3%	low	unclear	low
Vianna et al. 2020		This study evaluated a cohort from Brazil (n=53), and included only females of several ages. IQ assessment was classified as milestone. Illumina platform was used for sequencing and GATK/ANNOVAR were used for variants calling and identification. The results were confirmed by Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 9.43%	low	low	low
Vissers et al. 2010		This study evaluated trios from Nijmegen, The Netherlands (n=10), using the SOLID platform for sequencing. A custom bioinformatic pipeline was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 70.00%	low	unclear	low
Willemsen et al. 2014		This study evaluated trios (n=34) from The Netherlands, and included individuals of several ages. IQ was assessed using validated instrument. SOLID platform was used for sequencing. The pipeline used for variants calling was not reported. The results were confirmed through Sanger methodology, obtaining a diagnostic rate of 32.35%	low	low	low

Xiang et al. 2021	This study evaluated trios (n=17) from China, including individuals under 18 years old. IQ assessment was done by validated instrument. Illumina platform was used for sequencing. GATK was used for variants calling. CNVs were reported from the WES data. The results were confirmed by Sanger methodology and reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 58.8 %	low	low	low
Xiao et al. 2018	This study evaluated a cohort from Shanghai/China (n=18), including individuals under 18 years of age. Illumina platform was used for sequencing and GATK was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG), obtaining a diagnostic rate of 61.11 %	unclear	low	low
Zhao et al. 2018	This study evaluated trios from Sweden (n=28). SOLiD, Illumina and Thermo Fisher platforms were used for sequencing. GATK was used for variants calling. The results were confirmed through Sanger methodology and were reported according to the Standard classification (ACMG). The reported diagnostic rate was of 21.43 %	low	unclear	low

Genome Analysis Toolkit (GATK). Intelligence quotient (IQ). Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS-2). Copy number variants (CNVs).

Table 3: The most significant biological processes, microRNA, KEGG and positional gene set regulators overrepresented in the ID Molecular Diagnosis and Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene sets.

	n total genes in the category	n genes from ID gene set	adjusted p value
ID Molecular Diagnosis gene set			
Gene Ontology biological process			
Neurodevelopment			
GO_HEAD_DEVELOPMENT	760	77	1.37e-17
GO_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	964	82	1.61e-14
GO_FOREBRAIN_DEVELOPMENT	376	42	2.82e-10
GO_NEURON_DIFFERENTIATION	1328	84	2.41e-8
GO_NEURON_DEVELOPMENT	1082	73	2.53e-8
GO_NEUROGENESIS	1572	94	2.53e-8
GO_NEUROMUSCULAR_PROCESS	105	19	1.18e-7
GO_COGNITION	291	31	3.56e-7
GO_TELENCEPHALON_DEVELOPMENT	246	28	4.51e-7
GO_GROWTH	953	63	7.09e-7
GO_SYNAPSE_ORGANIZATION	400	36	1.13e-6
GO_SYNAPTIC_SIGNALING	704	50	3.06e-6
GO_AXON_DEVELOPMENT	502	40	4.05e-6
GO_NEURON_MIGRATION	153	19	2.41e-5
GO_EMBRYO_DEVELOPMENT	978	55	3.93e-4
GO_DENDRITE_DEVELOPMENT	219	20	7.04e-4
GO_ASSOCIATIVE_LEARNING	77	11	1.11e-3
Epigenetics process			

GO_CHROMOSOME_ORGANIZATION	1167	87	2.97e-12
GO_COVALENT_CHROMATIN_MODIFICATION	453	45	1.62e-9
GO_CHROMATIN_ORGANIZATION	762	61	1.83e-9
GO_HISTONE_METHYLATION	138	21	3.56e-7
GO_METHYLATION	353	34	6.24e-7
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_GENE_EXPRESSION	1907	100	2.90e-6
GO_REGULATION_OF_HISTONE_MODIFICATION	139	18	2.64e-5
GO_HISTONE_H3_K4_METHYLATION	56	10	4.45e-4

Cellular process

GO_ORGANELLE_LOCALIZATION	679	53	7.94e-8
GO_REGULATION_OF_CELL_CYCLE	1156	68	1.06e-5
GO_MICROTUBULE_CYTOSKELETON_ORGANIZATION	529	39	2.96e-5
GO_CELL_CELL_SIGNALING	1619	84	4.34e-5
GO_ION_TRANSPORT	1635	77	1.90e-3
GO_REGULATION_OF_CELL_DEVELOPMENT	904	49	2.06e-3

Immunological process

GO_TYPE_I_INTERFERON_PRODUCTION	123	13	3.64e-3
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_TYPE_I_INTERFERON_PRODUCTION	76	8	4.01e-2

Circadian rhythm

GO_CIRCADIAN_RHYTHM	195	16	8.85e-3
---------------------	-----	----	---------

microRNA

GTGCAA_MIR507	127	17	2.43e-5
AAGTCCA_MIR422B_MIR422A	70	13	2.43e-5
ACCATTT_MIR522	162	18	1.18e-4
CCCACAT_MIR2993P	53	10	1.67e-4
TAGCTTT_MIR9	236	21	2.99e-4
GTTTGTT_MIR495	255	22	2.99e-4

GCGACTT_MIR519E	122	14	4.99e-4
CACTGTG_MIR128A_MIR128B	337	25	7.56e-4
ACAACCT_MIR453	44	8	8.74e-4
TGCACTG_MIR148A_MIR152_MIR148B	305	23	8.88e-4
TTTGCAC_MIR19A_MIR19B	512	31	2.57e-3
GTGCAAT_MIR25_MIR32_MIR92_MIR363_MIR367	306	21	4.26e-3
TTGCACT_MIR130A_MIR301_MIR130B	400	25	4.26e-3
AACATTC_MIR4093P	144	13	4.26e-3
TTTGCAG_MIR518A2	210	14	1.66e-2
KEGG			
KEGG_LYSOSOME	121	14	1.44e-5
KEGG_TIGHT_JUNCTION	131	14	3.54e-5
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	325	22	7.26e-3
KEGG_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARVC	73	8	2.02e-2
KEGG_AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	44	6	2.23e-2
KEGG_TYPE_II_DIABETES_MELLITUS	47	6	2.78e-2
Positional gen set			
chrXp11	169	17	3.57e-3
Inconclusive ID Molecular Diagnosis gene set			
KEGG			
KEGG_RENIN_ANGIOTENSIN_SYSTEM	17	5	3.32e-2
Positional gen set			
chrXp11	169	17	1.07e-4
chrXp22	120	13	5.61e-4
chrXq23	26	6	2.16e-3
chrXq26	62	8	6.03e-3
chrXq21	38	6	1.23e-2
chrXq28	113	10	1.35e-2

chrXp21	28	5	1.67e-2
chrXq24	45	6	1.98e-2
chrXq22	91	8	3.79e-2

Gene Ontology (GO). MicroRNA (MIR). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

MUTREV-D-21-00078R1

Supplementary methodology and supplementary figures:Systematic review of reviews:

Aiming to systematically assess the reviews about the use of WES in DI do far, we performed a specific search for reviews. A systematic review in six databases (PubMed/Medline, Web of Science, Scopus, Science Direct, BIREME, and PsycINFO) was conducted using the same key terms, but selecting only review and/or systematic review papers, without limiting by publication date. This resulted in a total of 300 titles, after excluding replications. Twenty-three articles were selected by title. After reading the abstracts, only 3 systematic reviews were included. They are summarized in (Table S1).

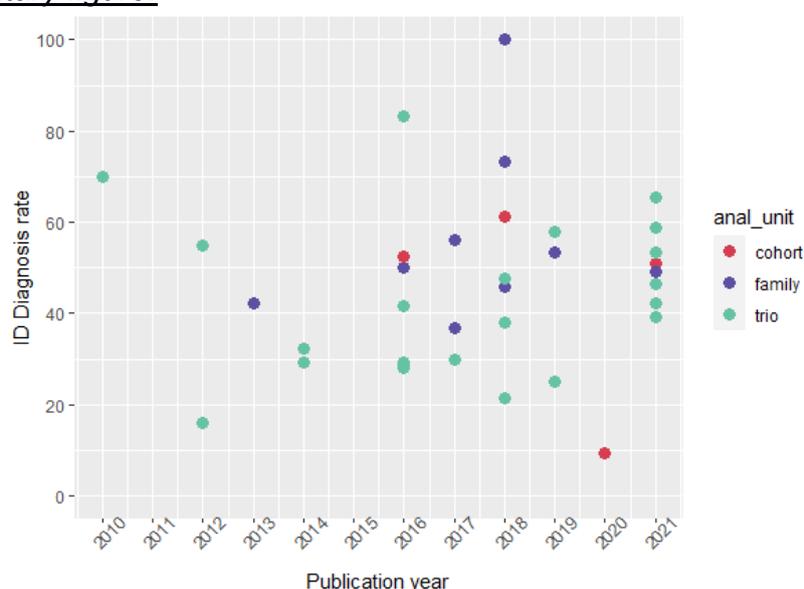
Supplementary figure:

Figure S1: Dot plot illustrating the relationship between the diagnostic rate (in proportions (%)) vs. the year of publication of the study by unit of analysis (N=35). Diagnostic rate for reanalysis studies were not included. Anal_unit: unit of analysis.

QUADAS-2:

The quality of the studies included in our systematic review was assessed with QUADAS2, a standard and recommended tool to check the quality of the articles for diagnostic accuracy and to detect possible risk of biases, which may distort the overall estimates.

The QUADAS-2 tool is recommended for use in systematic reviews of diagnostic accuracy by the Agency for Healthcare Research and Quality, Cochrane Collaboration and the U.K. National Institute for Health and Clinical Excellence (U.K.) [1]. We used it to emphasize how the WES was performed and interpreted in all studies included in the review.

As suggested by Whiting (2011) [1], the QUADAS-2 scale should be modified, as its implementation is more appropriate to the reality of the test evaluated. In this sense, two domains are adapted for risk of bias:

1.- DOMAIN 2: INDEX TEST(S): Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? Or, if a threshold was used, was it pre-specified?

The master question: Could the conduct or interpretation of the index test introduce bias? This was answered based on a description of how the WES was performed and interpreted. The signal questions mentioned above have the same answer for all cases, with no and yes, respectively.

The WES is a molecular technique that is well standardized in its conduct, and with a large amount of bioinformatics that help in its interpretation. This was reflected in the results with high sensitivity and specificity. Even so, it is impossible to perform it without knowledge of the clinical condition of the individual with ID.

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING: Was there an appropriate interval between the index test(s) and reference standard?

Although the patient's clinical phenotype may vary with the passage of time, it is important to make a timely clinical diagnosis for DI. So far, there is no established reference window. In this sense, we were not able to objectively evaluate this signal question in our study. Additionally, many studies do not even report the date of the moment of clinical and molecular diagnosis, making it impossible to establish a temporal relationship between the standard test and the index.

Applicability definition:

About the applicability, evidence from a primary study may have limited applicability to the review if, compared with the review question, the study was conducted in a patient group with different demographic or clinical features, the index test was applied or interpreted differently, or the definition of the target condition differed [1].

Figure S2 shows the risk of bias and applicability, using QUADAS-2, summarized results.

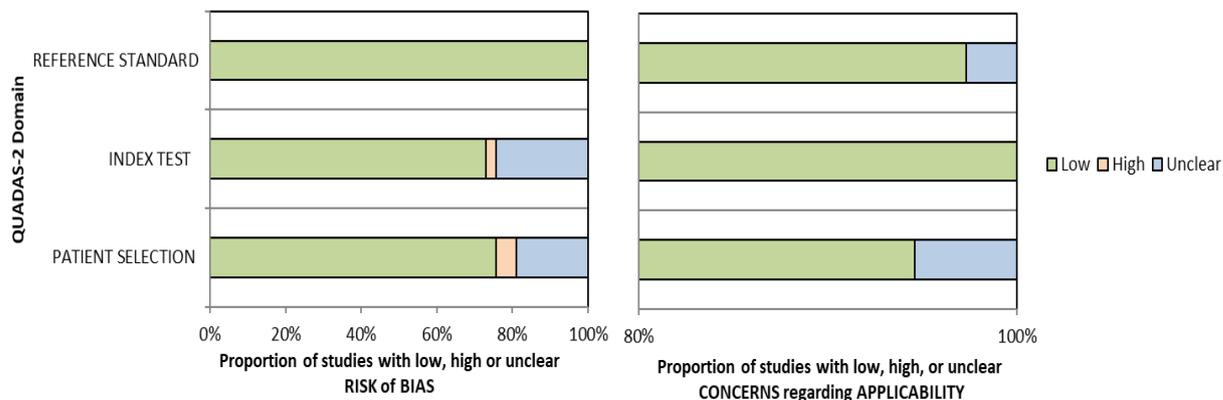


Figure S2: Summary of quality of all 37 studies included in the meta-analysis according to QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2) criteria, with respect to risk of bias (left) and concerns regarding applicability (right).

Publication Bias:

Publication bias was analyzed and represented by a funnel plot, and funnel plot symmetry was assessed using Peter's and Egger's tests.

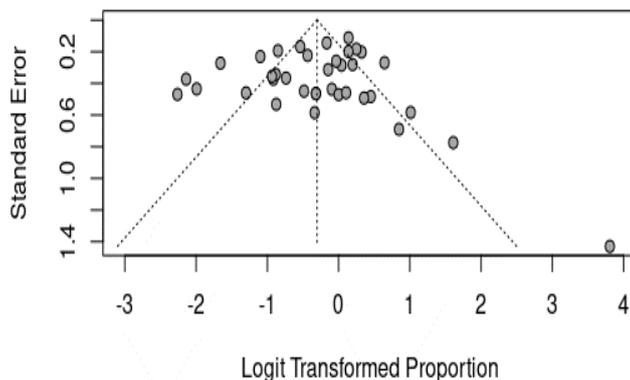


Figure S3: The funnel plot (n= 37 studies). The vertical and diagonal dashed lines represent the overall estimated effect size and its 95% confidence limits, respectively.

Linear regression test of funnel plot asymmetry: p-value = 0.7758, Peters et al. (2006) [2] and p-value = 0.3978, Egger et al. (1997) [3]. A p-value below 0.05 suggests a strong probability that the distribution is not random, suggesting publication bias. Therefore, according to the tests described above, we can interpret our results as showing no evidence of publication bias.

References:

- [1] P.F. Whiting, A.W.S. Rutjes, M.E. Westwood, S. Mallett, J.J. Deeks, J.B. Reitsma, M.M.G. Leeflang, J.A.C. Sterne, P.M.M. Bossuyt, QUADAS-2 Group, QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies, *Ann. Intern. Med.* 155 (2011) 529–536. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009>.
- [2] J.L. Peters, A.J. Sutton, D.R. Jones, K.R. Abrams, L. Rushton, Comparison of two methods to detect publication bias in meta-analysis, *JAMA.* 295 (2006) 676–680. <https://doi.org/10.1001/jama.295.6.676>.
- [3] M. Egger, G. Davey Smith, M. Schneider, C. Minder, Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test, *BMJ.* 315 (1997) 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>.

Apêndice A. Informações de apoio os dados suplementares associados a este artigo podem ser encontrados na versão on-line em

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383574222000187?via%3Dihub>

Submetido para:
Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry
Julho 2023

Evaluation of genomic factors and early childhood stimulation on intelligence in children from a Brazilian birth cohort: the primary role of independent factors

Karen Y. Sánchez-Luquez^a, Marina Xavier Carpena^a, Simone M. Karam^b, Thais Martins-Silva^{a, c}, Fernando Barros^a, Isabel O. de Oliveira^a, Iná S. Santos^a, Aluísio J. D. Barros^a, Alicia Matijasevich^d, Luciana Tovo-Rodrigues^{a, *}

^aPostgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

^bPostgraduate Program in Public Health, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil.

^cHuman Development and Violence Research Centre (DOVE), Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; 1 Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

^dDepartment of Preventive Medicine, School of Medicine FMUSP, University of São Paulo, SP, Brazil.

Key points:

Understanding if the genetic factors of intelligence respond differentially to early environmental exposures is still needed

Intelligence polygenic score was associated with IQ at 6 years in a Brazilian cohort

Parental socio-cognitive stimulation at 2 and 4 years pivots children's IQ at 6 years

Environmental stimulation did not modify intelligence polygenic score effect on IQ

ABSTRACT

Background: Childhood cognitive abilities are a predictor of health outcomes and adult income potential. Identifying factors associated with childhood intelligence and their interactions is essential in behavioral research. We assessed the impact of genetic variants and early child stimulation (ECS) on child intelligence and examined their possible interaction as potential modifiers of IQ in a population-based longitudinal study.

Methods: Participants in the 2004 Pelotas Birth Cohort (N = 4231) underwent Intelligent quotient (IQ) by WISC-III assessment at 6 years of age. At 24 and 48-months, mothers answered five ECS marker questions, whose sum was used to create a score. The polygenic score for intelligence (IQ-PGS) was constructed from the GWAS-weighted estimate of cognition. Association was assessed using multiple linear regression models adjusted for maternal, family, and child confounding variables. **Results:** In the adjusted analysis, IQ-PGS ($\beta = 0.79$, 95% confidence interval [95% CI] 0.26;1.31) as well as ECS ($\beta = 2.34$; 95% CI: 1.76;2.92) were associated with IQ in this sample. However, there was no interaction between IQ-PGS and ECS on IQ ($p_{(IQ-PGS \times ECS)}=0.46$). **Conclusions:** ECS did not modify the impact of genetic potential on intellectual development during childhood, suggesting that genetic factors and ECS exert independent effects on the IQ levels of children.

Keywords: intelligence, gene–environment interaction, cognitive stimulation and social interaction, polygenic score

Abbreviations: ECS: early child stimulation, Whole-exome sequencing; IQ: intellectual quotient; PGS: polygenic score; IQ-PGS: polygenic score for intelligence; GWAS: genome wide association studies; GE: gene–environment; WISC-III: Wechsler Intelligence Scale for Children-III; WASI: Wechsler Adult Intelligence Scale; MAB: Multidimensional Aptitude Battery; SON_R: Snijders-Oomen Non-Verbal Intelligence Test – Revised; PT: p value threshold; EPDS: "Edinburgh" Postnatal Depression Scale; DNA: Deoxyribonucleic acid; SNP: single-nucleotide polymorphism.

1. Introduction

Cognitive abilities, such as intelligence in childhood, which is typically assessed through intelligence quotient (IQ) testing, serve as a crucial predictor of health status, academic performance, occupation, and income potential during adulthood (Batty et al., 2007; Kenyhercz et al., 2022; Schmitt, 2014). Childhood represents a crucial phase in the progression of IQ. IQ increases rapidly in the early years of life due to brain development, followed by stabilization around 10 years of age (Braaten & Norman, 2006; Deary, 2012). Thus, a deeper understanding of the relationships between determinants of childhood intelligence could elucidate modifying factors in this sensitive period when intelligence has not yet reached stability.

Intelligence is a multifactorial trait whose heritability increases significantly between childhood (20%) and adulthood (60%) (C. Haworth et al., 2010; C. M. A. Haworth et al., 2009; Plomin & Deary, 2015; Trzaskowski et al., 2014), indicating a complex relationship between gene and environment throughout an individual's life cycle. A potential explanation of the increase in heritability with increasing age, reinforced by genome wide association studies (GWAS), would involve the underlying role of gene–environment (GE) interaction in IQ (Sauce & Matzel, 2018a). The GE model denotes a conditional relationship in which the effects of genes on intelligence depend on the environment (Sauce & Matzel, 2018b). Research supports the theory that environmental factors play a crucial role in modulating the manifestation of genetic potential and its impact on IQ (C. Haworth et al., 2010; Kovas et al., 2007; Plomin & von Stumm, 2018). Some studies in adults provide support for the interaction between genetic and environmental factors (Rask-Andersen et al., 2021). However, the determinants and mechanisms involved in this interaction during childhood remain inadequately explored.

Recent GWASs on IQ have shown that intelligence is a highly polygenic trait, with contributions from thousands of small effector genetic variants, most notably genes encoding proteins related to neuronal functions, including synaptic function and plasticity, cellular interactions, and energy metabolism (Lee et al., 2018; Savage et al., 2018). Polygenic scores (PGS) constructed from these genomic studies have been useful to explain a considerable percentage of variation in general intelligence in populations of European ancestry from high-income countries, mainly in adults, with few studies in children (Cheesman et al., 2022; Genç et al., 2021a; Loughnan et al., 2020; Savage et al., 2018; Töllli et al., 2022). It is, therefore, crucial to investigate the

interpretation and applicability of PGS in populations of different backgrounds and in other age groups (Genç et al., 2021b)

Regarding environmental factors, some recent studies have highlighted a relationship between a favorable childhood environment and intelligence (Schoentgen et al., 2020). Although plasticity persists throughout life, early childhood stands out since there is greater potential for modification by factors external to the individual or environmental factors (Jansen et al., 2015). For example, parental cognitive stimulation is a strong predictor of cognitive abilities among children (Brooks-Gunn et al., 2010; Han et al., 2022; Lawlor et al., 2006). Thus, identifying potentially modifiable factors amenable to care/stimulation-related interventions during child development remains of interest in human IQ research (Engle et al., 2007, 2011; Maulik et al., 2011), continua sendo de interesse na pesquisa do QI humano.

Considering the postulates of the GE theory, it becomes relevant to understand whether the genetic traits of intelligence of individuals respond differentially to environmental exposures throughout life, especially in early childhood. Even countries with very low inequality and relatively homogeneous socio-cultural environment show an important relationship between socioeconomic level and schooling on IQ (Sauce & Matzel, 2018b). Thus, it is possible to assume that GE interaction studies, in middle-income countries (World Bank, 2023), could represent more suitable models to test the GE relationship, as they have greater environmental diversity due to greater social and economic inequality.

In this study, we aimed to investigate the role of genetic and early childhood environmental factors in the IQ of children from the 2004 Pelotas Birth Cohort (Brazil). The specific objectives of the study are to test: (i) the role of genetic factors associated with intelligence in adults on children's IQ, using a polygenic index; (ii) the association between measures of early child stimulation and IQ at the age of 6; (iii) and the GE interaction between both factors (early child stimulation) on children's IQ.

2. Methods

2.1. Participants

This study analyzes data from participants of the 2004 Pelotas Birth Cohort. From January 1 to December 31, 2004, 4,231 live births were recruited from mothers residing in the urban area of the municipality of Pelotas, southern Brazil, representing 99.2% of all births that occurred in the city in that year. Using a structured questionnaire, detailed information was obtained on demographic, socioeconomic, behavioral, and biological

characteristics, as well as reproductive history, and health care utilization. Participants were assessed at birth (perinatal study), 3, 12, 24, and 48 months, and at 6, 11, 15, and 18 years of age. The detailed methodology of the cohort has been previously published (I. Santos et al., 2014; I. S. Santos et al., 2011).

For this study, information collected in the perinatal study and at 3, 24, and 48 months and 6 years of age was included, with follow-up rates of 99.2%, 95.7%, 93.5%, 92.0%, and 90.2%, respectively. Follow-ups at 3, 12, 24, and 48 months were carried out at home, and the 6-year follow-up was carried out at the Dr. Amilcar Gigante Health Research Center, a clinic specially designed for the cohort's follow-ups. Children with severe conditions that may be associated with very low IQ (e.g., intellectual disability of genetic, environmental, or multifactorial etiology; N = 31) were excluded from the very low IQ (e.g., intellectual disability of genetic, environmental, or multifactorial etiology; N = 31) were excluded from the study (Karam et al., 2015). For twin births, only one participant was included in the study.

2.2. Outcome

The Wechsler Intelligence Scale for Children-III (WISC-III) validated for the Brazilian population (Wechsler, 2002) was applied by trained psychologists. This scale was composed of four subtests: two verbal (similarities and arithmetic) and two performance (building blocks and filling in boxes) tests. A short version of the scale was used due to time constraints and the large number of assessments. This version was developed by Kaufman (Kaufman et al., 1996) and showed a correlation above 0.90 with IQ measured by the full scale. Score conversion tables for the American population were used to calculate IQ scores from the subtests, as suggested by Camargo et al. (Camargo-Figuera et al., 2014). Scoring tables for the Brazilian population (Figueiredo et al., 1998) were not used since those available were created for wider age groups and an age effect on child IQ has been described. For the present study, the original raw continuous form IQ value was used.

2.3. DNA sampling, genotyping and imputation

Genomic DNA was extracted from saliva samples collected at 6 years of age, following the manufacturer's recommendations (Oragene GenotekVR - kit 250). DNA samples were genotyped using Infinium Global Screening Array v.2 (Illumina). For non-genotyped genetic variants, imputation was performed with the *minimac3* tool, based on the global population from phase 3 of the 1000 Genomes Project as a reference panel. Applying

quality controls, imputed and genotyped SNPs were filtered to include only those with (i) <2% missing genotypes, (ii) imputation quality score ($R^2 > 0.3$), and (iii) least frequent allele frequency (MAF) ≥ 0.01 , using PLINK 1.9 (Purcell et al., 2007). Variants deviating from the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ($p < 1e-6$) were excluded before score construction. Following quality control (Lam et al., 2020), 11,811,746 genetic markers were generated.

2.4. Polygenic Score

From the available genetic variants, a PGS was constructed based on the summary statistics for recent publicly available GWAS on intelligence (IQ-PGS) (Savage et al., 2018). This score was generated using GWAS data from a meta-analysis of 14 independent epidemiological cohorts of European ancestry. The sample consisted of 269,867 individuals, mostly adults (Savage et al., 2018). The study identified 242 independent genetic variants associated with outcome ($P < 5e-8$). The assessed phenotype was either a quantitative measure of intelligence consisting of a principal component drawn from multiple tests of different cognitive subdomains (g-factor), or a composite measure score with multiple subdomain tests included by design (full IQ scores from the WISC, Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) (Wechsler, D., 2008), Multidimensional Aptitude Battery (MAB)(Jackson, Douglas Northrop, 1998) or Snijders-Oomen Non-Verbal Intelligence Test - Revised (SON-R) (Tellegen & Laros, 1998); a measure of fluid intelligence plus verbal and mathematical reasoning items; or the college entrance exam that has verbal and mathematical reasoning components). The PGS for each participant was constructed from the sum of the alleles associated with IQ (p value threshold -PT- $5e-8$) weighted by their effects on each summary statistic, using the program PRSice 2.0 (Choi & O'Reilly, 2019). The resulting score was subsequently standardized into z-scores.

2.5. Stimulation score

At the 24- and 48-month follow-up of the cohort, information was collected regarding five markers of cognitive stimulation and social interaction. Mothers were asked the following questions: (i) "In the last week, has anyone read or told stories to the child? (yes, someone has; yes, recording; and yes, both);" (ii) "In the last week, has the child ever been to the square or the park? (yes/no);" (iii) "In the last week, has the child gone to other people's houses (yes/no);" (iv) "Does the child have any books or magazines of his/her own at home? (yes/no);" and (v) Does the child watch television? (yes/no/TV

always on)." The positive responses were summed to compose a score ranging from 0 to 5 at each follow-up, and the mean value of the score assessed at 24 and 48 months was considered the exposure in this study, in order to have a temporal, rather than just a point-in-time, assessment of the children's cognitive stimulation over the first years of life. Details of the score have been previously published (Matijasevich et al., 2020).

2.6. Covariates

Variables previously associated with IQ and/or cognitive stimulation scale in our study population (Barros et al., 2010; Camargo-Figuera et al., 2014; Matijasevich et al., 2020) were included as covariates in the analyses. Participant characteristics were sex (male or female), prematurity (gestational age <37 weeks), and mother-reported skin color of the child (categorized as white, non-white). The mother and family characteristics assessed at birth were self-reported maternal age, maternal education (0–4 years, 5–8 years, ≥9 years), parity (including the child in the cohort) (1, 2, ≥3), maternal smoking during pregnancy (yes or no), total family income (quintiles adjusted to the minimum wage of the study population), and the depressive symptomatology score obtained by the "Edinburgh" Postnatal Depression Scale (EPDS) instrument (I. S. Santos et al., 2007) assessed at the 12-month follow-up. In addition to the variable sex and ancestry, the first 10 genomic principal components, estimated using the program PLINK1.9 (Purcell et al., 2007), were used as covariates for the genetic association analyses to avoid population stratification bias (Byun et al., 2017).

2.7. Statistical analysis

The association between PGS and IQ at the age of 6 was tested using crude and adjusted linear regression models, using sex and the first 10 principal components as adjustment variables. The predictive power of GWAS-derived PGS was measured by the incremental R^2 , the estimated R^2 difference between the full model (all covariates including IQ-PGS) and the null model (not including IQ-PGS) (Lee et al., 2018). The association between ECS and IQ at the age of 6 was tested using crude and adjusted linear regression models for the following covariates: mother's age, gestational age, skin color, smoking during pregnancy, maternal depressive symptomatology, prematurity, parity, and socioeconomic status in quintiles.

To test the effect of ECS on IQ-PGS on IQ at the age of 6 years, we used crude and adjusted multiplicative linear regression models. Sex, gestational age, smoking during pregnancy, maternal depressive symptomatology, prematurity, parity, maternal age,

maternal education, socioeconomic status in quintiles, and the first 10 principal components were used as adjustment covariates.

After building the 10 principal components in the program PLINK1.9 and IQ-PGS in the program PRSice 2.0 (Euesden et al., 2015), the data were imported and analyzed in R version 4.2.2 – Rstudio (R Core Team, 2022). The statistical package "stats" was used for standardizing PGS into z-score and for performing all statistical analyses. The results were expressed as Beta coefficient (β) of the regression and 95% confidence intervals (95% CI) and p-value (p). They were considered statistically significant when $p < 0.05$. The statistical package "pwr.r.test" was used to determine the statistical power ($1 - \beta = 0.8$) of the regression model for an effect size of the interaction coefficient β value. Power analysis for interaction models, computed by changing the Pearson correlation = R^2 , was performed with the package "InteractionPowerR" (Baranger et al., 2022). The graphs were created using the packages "sjplot" and "ggplot2".

2.8. Ethical considerations

All follow-up phases of the 2004 Pelotas Birth Cohort were approved by the Research Ethics Committee of the School of Medicine of the Federal University of Pelotas. The genomic studies were also approved by the National Research Ethics Committee (CONEP). All mothers or guardians of participating children signed an informed consent form before data collection.

3. Results

3.1. Sample characteristics

The maternal and individual characteristics of all participants ($N = 4,231$), as well as the differences between the group included in the analysis and the original cohort, are presented in Table 1. A total of 3,513 participants had both IQ data and one of the exposure variables (IQ-PGS or ECS) and could be included in the analyses. Of the total sample included in the study, 51.7% were male, 13.4% were born prematurely, and 67.7% were white. Of the mothers of the participants, at the time of delivery, 18.9% were under 19 years of age and 13.7% were over 35 years of age, 15.0% had less than 4 years of formal education, 33.6% had three children or more, around 27.0% reported smoking during pregnancy, and 27.4% had EPDS ≥ 10 at the 12-month follow-up. We did not obtain significant differences when comparing to the total cohort for any of the covariates. The mean IQ score at 6 years of age was 78.5 points (standard deviation - SD: 15.95). The overall mean stimulation score was 3.5 points (SD=0.9) (Table 1).

Regarding cognitive stimulation and social interaction, in the week before the interview, at the 24- and 48-month follow-ups, respectively, 53.3% and 66.8% of the children had heard children's stories; 41.7% and 54.0% had gone to a square or park; and 89.6% and 88.9% had gone to other people's houses. At 24 and 48 months, respectively, 56.1% and 77.2% of the children had a storybook or magazine at home; and 83.9% and 96.4% watched TV (data not shown).

3.2. Association between IQ-PGS, ECS, and IQ

A total of 3,329 individuals had genetic and IQ information. Table 2 presents the results of the association between the tested IQ-PGI and IQ scores at the age of 6 years for the crude and adjusted models. After adjustment, each 1 SD increase in the score was associated with a mean increase of 0.79 IQ points at the age of 6 (95% CI: 0.26; 1.31; $p=0.003$). The inclusion of IQ-PGS increases the adjusted R^2 of the model by 0.23%.

Table 2 also presents the results of the association between the mean early cognitive stimulation and social interaction score (at 24 and 48 months) and IQ assessed at 6 years of age ($N = 3,344$). In the crude analysis, on average, one additional point in ECS score corresponded to a 6.45-point increase in IQ ($p < 0.001$). After adjustment for confounding factors, the measure of association corresponded to an increase of just 2.34 points on average in IQ for each additional point in cognitive stimulation score (95% CI: 1.76; 2.92; $p < 0.001$).

3.3. Interactions between ECS and QI-PGS on QI

The results of the interaction model between the cognitive stimulation scale and the IQ-PGI are presented in Fig. 1. We observed no statistical interaction between the variables analyzed in both crude ($N = 3,160$, β : 0.32; 95% CI: -0.24; 0.88; $p = 0.27$) and adjusted ($N = 3,053$, β : 0.19; 95% CI: -0.32; 0.7; $p = 0.46$) models. ECS has an important effect on IQ, independent of IQ-PGS values. Our analyses had sufficient statistical power, above 95%, to detect the observed effect in our sample size.

4. Discussion

In this study we aimed to evaluate the association of genetic and environmental factors, as well as their interaction, with intelligence in children from a middle-income cohort. We identified in our study that genetic factors that had previously been associated with intelligence in European adults and non-Latino children over the age of 9 were also

associated with IQ in early childhood. Furthermore, we observed that ECS are important determinants of intelligence in childhood. However, we did not find important modifying effects of IQ-PGS and early stimulation on IQ.

Studies on genetic factors of intelligence have advanced in recent years. Several studies have shown that polygenic scores are predictive in adults and young adults (Cheesman et al., 2022; Genç et al., 2021b; Loughnan et al., 2020; Savage et al., 2018; Töllli et al., 2022). Genç et al. observed, in 557 healthy adults of German origin, good score performance for general, verbal, and numerical intelligence. Non-verbal intelligence and memory showed lower performance (Genç et al., 2021b). Knowledge about the genetics of IQ in children is still insufficient. Loughnan et al. showed the predictive power of a PGS for IQ in children aged 9–11 years (N = 11,875) in the United States, emphasizing greater predictive power in domains of crystallized intelligence than of fluid intelligence (Loughnan et al., 2020). In our study, we demonstrated that genetic factors identified in adults overlap, at least partially, with intelligence behavior during childhood, in agreement with previous findings (Loughnan et al., 2020). The paucity of research in this area reinforces the need for further studies in children through longitudinal studies to understand the genetic mechanisms and heritability gain throughout the life cycle reported in the literature.

We also found that parental environmental stimulation has an important effect on children's intelligence. These results agree with previous studies in the same cohort, which showed that cognitive stimulation and social interaction performed in the first years of life was associated with child development, as assessed by the Battelle Development Inventory, at 24 months of age (Barros et al., 2010); and that cognitive stimulation was associated with reduced risk of attention-related executive function deficits at 11 years of age (Matijasevich et al., 2020). The findings are also consistent with the literature, which suggests that children's understanding develops gradually in the context of social interaction (Carpendale & Lewis, 2004). There is also an association between poverty and executive functions, which have been widely claimed to be central features of intelligence (Miller & Cohen, 2001), so that cognitive stimulation and environmental enrichment are common mediating variables that may also be moderators and targets for intervention (Haft & Hoefft, 2017). Thus, cognitive stimulation and social interaction in early childhood may represent a protective factor for cognitive impairments. Our results corroborate the importance of promoting social interventions aimed at cognitive stimulation in more socioculturally vulnerable populations.

Although we found both factors to be relevant for intelligence, we did not find an interaction between them. Our findings are supported by other results in the literature. A

recent study assessed whether temperament modifies the association between polygenic intelligence scores and cognitive test performance in midlife in Finnish adults (N = 1,647) using a PGS based on the same GWAS used in the current study, and found that temperament was not related to genetic influence on intelligence and that it also did not modify the association between polygenic intelligence scores and cognitive performance (Töllli et al., 2022). On the other hand, the GE interaction has been observed in some studies. A recent study with a sociogenic approach in Norway, which included more than 23,000 parent-child trios, investigated interactions between PGS for education and levels of environmental exposure, composed of information from the following factors: child, parents, school, neighborhood, district, and municipality. The authors showed that there was interaction between genetic factors and school type (Cheesman et al., 2022). The absence of interaction in our study could be justified by the fact that many DNA markers with possible effect on the GE interaction are epistatic or epigenetic markers, with small detectable main effect, and might be missed in typical GWAS analyses (Sauce & Matzel, 2018b), and, thus, they were not detected in our study either. Moreover, physiologically, the effect of the GE interaction may be small early in life but cumulative over the years, having a higher effect in IQ in the adult population (Jim, 2013). Thus, the interaction between genetic and environmental factors is still a focus of discussion in the scientific community, necessitating more studies exploring similar stimuli in early childhood with large sample sizes.

Among the limitations of the current study, it was not possible to assess specific domains of IQ. Additionally, child stimulation was inferred using five stimulus markers and the attention given to children, but we did not have a detailed assessment of the family environment and parent-child interactions. Another limitation concerns the transferability of the polygenic score (Grinde et al., 2019), there is still much discussion about the interpretation and applicability of PGS in populations of different ethnic backgrounds and in other age groups (Genç et al., 2021b) and/or its relationship with the environment, especially in early childhood, when IQ is not yet stabilized. Considering the higher rate of ethnic admixture in the Brazilian population compared to the European population, it is possible that effects of some SNPs relevant for IQ in the Brazilian population were not considered in the baseline European GWAS. Thus, one might expect the effect of the genetic score to be underestimated. However, power calculations indicated that our analyses had sufficient power to detect small effects.

One of the main strengths of this study is the origin of the population, from a middle-income country. This is important because a substantial proportion of the population in these countries is exposed to more adverse contexts when compared to rich countries,

as well as the variability of environmental scenarios being greater than in rich countries, and the effect of the genetic variable can be explored in a GE interaction study. Another important strength of this study is its longitudinal design, which allows for reduced recall and response bias with respect to children's ECS, as well as adequate adjustment for covariates collected during the perinatal visit. Additionally, this is one of the few studies exploring IQ on a population basis employing the most widely recommended intelligence tests for large-scale application. Another strength was the method of data collection combined with the use of standardized measures performed by trained field workers, high follow-up rates, and low proportion of missing data for most variables, resulting in sufficient statistical power to support our results. This is one of the few studies of genomic traits in a relatively large number of individuals in a population-based longitudinal cohort, which allowed us to test statistical models, including adjustment variables to ensure reduction of confounding effects.

Finally, the results of this study suggest that both genetic factors, as assessed by polygenic score, and environmental factors, as assessed by early parental behavioral and cognitive stimulation, play an important role in childhood cognition in a population-based longitudinal study of a Brazilian sample. Additionally, we observed no evidence that environmental stimulation modifies the genetic effect on IQ. Additional studies, in middle-income countries, are desirable to expand the knowledge about the complex relationship between environmental and genetic factors in intelligence.

Acknowledgments

The authors would like to thank the cohort participants and their families, as well as the administrative and field staff, who collaborated in the various stages of the study of the 2004 Pelotas birth cohort.

Funding

This article is based on data from the study "Pelotas Birth Cohort, 2004" conducted by Postgraduate Program in Epidemiology at Universidade Federal de Pelotas, with the collaboration of the Brazilian Public Health Association (ABRASCO). From 2009 to 2013, the Wellcome Trust supported the 2004 birth cohort study. The World Health Organization, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), Brazilian National Research Council (CNPq), Brazilian Ministry of Health, and Children's Pastorate supported previous phases of the study. São Paulo Research Foundation (FAPESP) [Grant no. 2014/13864-6 e Grant no. 2020/07730-8], and L'Oréal-Unesco-ABC Program for Women in Science in Brazil also funded the study. LTR, ISS, AJDB, and AM are supported by CNPq Research Scholarship and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Disclosure Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

***Corresponding author:** Luciana Tovo-Rodrigues – Post-graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil, Mal. Deodoro Street 1160, 2th floor, Pelotas-RS, Brazil; ZIP code 96020-220 Tel./Fax: +55 53 32841300, e-mail: luciana.tovo@gmail.com

References

Baranger, D. A., Finsaas, M., Goldstein, B., Vize, C., Lynam, D., & Olino, T. (2022).

Tutorial: Power analyses for interaction effects in cross-sectional regressions.

PsyArXiv. <https://doi.org/10.31234/osf.io/5ptd7>

- Barros, A. J., Matijasevich, A., Santos, I. S., & Halpern, R. (2010). Child development in a birth cohort: Effect of child stimulation is stronger in less educated mothers. *International Journal of Epidemiology*, 39(1), 285–294. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp272>
- Batty, G. D., Deary, I. J., & Gottfredson, L. S. (2007). Premorbid (early life) IQ and later mortality risk: Systematic review. *Annals of Epidemiology*, 17(4), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2006.07.010>
- Braaten, E. B., & Norman, D. (2006). Intelligence (IQ) testing. *Pediatrics in Review*, 27(11), 403–408.
- Brooks-Gunn, J., Han, W.-J., & Waldfogel, J. (2010). First-Year Maternal Employment and Child Development in the First Seven Years. *Monographs of the Society for Research in Child Development*, 75(2), 7–9. <https://doi.org/10.1111/j.1540-5834.2010.00562.x>
- Byun, J., Han, Y., Gorlov, I. P., Busam, J. A., Seldin, M. F., & Amos, C. I. (2017). Ancestry inference using principal component analysis and spatial analysis: A distance-based analysis to account for population substructure. *BMC Genomics*, 18(1), 789. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4166-8>
- Camargo-Figuera, F. A., Barros, A. J. D., Santos, I. S., Matijasevich, A., & Barros, F. C. (2014). Early life determinants of low IQ at age 6 in children from the 2004 Pelotas Birth Cohort: A predictive approach. *BMC Pediatrics*, 14, 308. <https://doi.org/10.1186/s12887-014-0308-1>
- Carpendale, J. I. M., & Lewis, C. (2004). Constructing an understanding of mind: The development of children's social understanding within social interaction. *The Behavioral and Brain Sciences*, 27(1), 79–96; discussion 96–151. <https://doi.org/10.1017/s0140525x04000032>

- Cheesman, R., Borgen, N. T., Lyngstad, T. H., Eilertsen, E. M., Ayorech, Z., Torvik, F. A., Andreassen, O. A., Zachrisson, H. D., & Ystrom, E. (2022). A population-wide gene-environment interaction study on how genes, schools, and residential areas shape achievement. *NPJ Science of Learning*, 7(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s41539-022-00145-8>
- Choi, S. W., & O'Reilly, P. F. (2019). PRSice-2: Polygenic Risk Score software for biobank-scale data. *GigaScience*, 8(7), giz082. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz082>
- Deary, I. J. (2012). Intelligence. *Annual Review of Psychology*, 63, 453–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-120710-100353>
- Deary, I. J., Spinath, F. M., & Bates, T. C. (2006). Genetics of intelligence. *European Journal of Human Genetics*, 14(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201588>
- Engle, P. L., Black, M. M., Behrman, J. R., Cabral de Mello, M., Gertler, P. J., Kapiriri, L., Martorell, R., Young, M. E., & International Child Development Steering Group. (2007). Strategies to avoid the loss of developmental potential in more than 200 million children in the developing world. *Lancet (London, England)*, 369(9557), 229–242. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60112-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60112-3)
- Engle, P. L., Fernald, L. C. H., Alderman, H., Behrman, J., O’Gara, C., Yousafzai, A., de Mello, M. C., Hidrobo, M., Ulkuer, N., Ertem, I., Iltus, S., & Global Child Development Steering Group. (2011). Strategies for reducing inequalities and improving developmental outcomes for young children in low-income and middle-income countries. *Lancet (London, England)*, 378(9799), 1339–1353. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60889-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60889-1)

- Euesden, J., Lewis, C. M., & O'Reilly, P. F. (2015). PRSice: Polygenic Risk Score software. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(9), 1466–1468. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu848>
- Figueiredo, V. L. M., Pinheiro, S., & Nascimento, E. do. (1998). Teste de inteligência WISC-III adaptando para a população brasileira. *Psicologia Escolar e Educacional*, *2*(2), 101–107. <https://doi.org/10.1590/S1413-85571998000200004>
- Genç, E., Schlüter, C., Fraenz, C., Arning, L., Metzen, D., Nguyen, H. P., Voelkle, M. C., Streit, F., Güntürkün, O., Kumsta, R., & Ocklenburg, S. (2021a). Polygenic Scores for Cognitive Abilities and Their Association with Different Aspects of General Intelligence—A Deep Phenotyping Approach. *Molecular Neurobiology*, *58*(8), 4145–4156. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02398-7>
- Genç, E., Schlüter, C., Fraenz, C., Arning, L., Metzen, D., Nguyen, H. P., Voelkle, M. C., Streit, F., Güntürkün, O., Kumsta, R., & Ocklenburg, S. (2021b). Polygenic Scores for Cognitive Abilities and Their Association with Different Aspects of General Intelligence—A Deep Phenotyping Approach. *Molecular Neurobiology*, *58*(8), 4145–4156. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02398-7>
- Grinde, K. E., Qi, Q., Thornton, T. A., Liu, S., Shadyab, A. H., Chan, K. H. K., Reiner, A. P., & Sofer, T. (2019). Generalizing polygenic risk scores from Europeans to Hispanics/Latinos. *Genetic Epidemiology*, *43*(1), 50–62. <https://doi.org/10.1002/gepi.22166>
- Haft, S. L., & Hoefl, F. (2017). Poverty's Impact on Children's Executive Functions: Global Considerations. *New Directions for Child and Adolescent Development*, *2017*(158), 69–79. <https://doi.org/10.1002/cad.20220>

- Han, Y., Yuan, M., Guo, Y.-S., Shen, X.-Y., Gao, Z.-K., & Bi, X. (2022). The role of enriched environment in neural development and repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 16*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.890666>
- Haworth, C. M. A., Wright, M. J., Martin, N. W., Martin, N. G., Boomsma, D. I., Bartels, M., Posthuma, D., Davis, O. S. P., Brant, A. M., Corley, R. P., Hewitt, J. K., Iacono, W. G., McGue, M., Thompson, L. A., Hart, S. A., Petrill, S. A., Lubinski, D., & Plomin, R. (2009). A twin study of the genetics of high cognitive ability selected from 11,000 twin pairs in six studies from four countries. *Behavior Genetics, 39*(4), 359–370. <https://doi.org/10.1007/s10519-009-9262-3>
- Haworth, C., Wright, M., Luciano, M., Martin, N., de Geus, E., van Beijsterveldt, C., Bartels, M., Posthuma, D., Boomsma, D., Davis, O., Kovas, Y., Corley, R., DeFries, J., Hewitt, J., Olson, R., Rhea, S.-A., Wadsworth, S., Iacono, W., McGue, M., ... Plomin, R. (2010). The heritability of general cognitive ability increases linearly from childhood to young adulthood. *Molecular Psychiatry, 15*(11), 1112–1120. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.55>
- Jackson, Douglas Northrop. (1998). *Multidimensional aptitude battery II: manual*. Sigma Assessment Systems Port Huron, MI. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Multidimensional+Aptitude+Battery%3A+Manual&publication_year=1984
- Jansen, A. G., Mous, S. E., White, T., Posthuma, D., & Polderman, T. J. C. (2015). What twin studies tell us about the heritability of brain development, morphology, and function: A review. *Neuropsychology Review, 25*(1), 27–46. <https://doi.org/10.1007/s11065-015-9278-9>
- jim. (2013, July 12). *Invest in Early Childhood Development: Reduce Deficits, Strengthen the Economy. The Heckman Equation.*

<https://heckmanequation.org/resource/invest-in-early-childhood-development-reduce-deficits-strengthen-the-economy/>

- Karam, S. M., Riegel, M., Segal, S. L., Félix, T. M., Barros, A. J. D., Santos, I. S., Matijasevich, A., Giugliani, R., & Black, M. (2015). Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: A population-based study. *American Journal of Medical Genetics. Part a*, *167*(6), 1204–1214. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37011>
- Kaufman, A. S., Kaufman, J. C., Balgopal, R., & McLean, J. E. (1996). Comparison of three WISC-III short forms: Weighing psychometric, clinical, and practical factors. *Journal of Clinical Child Psychology*, *25*(1), 97–105.
- Kenyhercz, F., Kósa, K., & Nagy, B. E. (2022). Perinatal, neonatal, developmental and demographic predictors of intelligence at 4 years of age among low birth weight children: A panel study with a 2-year follow-up. *BMC Pediatrics*, *22*, 88. <https://doi.org/10.1186/s12887-022-03156-x>
- Kovas, Y., Haworth, C. M. A., Dale, P. S., & Plomin, R. (2007). The genetic and environmental origins of learning abilities and disabilities in the early school years. *Monographs of the Society for Research in Child Development*, *72*(3), vii, 1–144. <https://doi.org/10.1111/j.1540-5834.2007.00439.x>
- Lam, M., Awasthi, S., Watson, H. J., Goldstein, J., Panagiotaropoulou, G., Trubetskoy, V., Karlsson, R., Frei, O., Fan, C.-C., De Witte, W., Mota, N. R., Mullins, N., Brügger, K., Lee, S. H., Wray, N. R., Skarabis, N., Huang, H., Neale, B., Daly, M. J., ... Ripke, S. (2020). RICOPILI: Rapid Imputation for COnsortias PIpeLIne. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *36*(3), 930–933. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz633>

- Lawlor, D. A., Najman, J. M., Batty, G. D., O'Callaghan, M. J., Williams, G. M., & Bor, W. (2006). Early life predictors of childhood intelligence: Findings from the Mater-University study of pregnancy and its outcomes. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 20(2), 148–162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2006.00704.x>
- Lee, J. J., Wedow, R., Okbay, A., Kong, E., Maghzian, O., Zacher, M., Nguyen-Viet, T. A., Bowers, P., Sidorenko, J., Karlsson Linnér, R., Fontana, M. A., Kundu, T., Lee, C., Li, H., Li, R., Royer, R., Timshel, P. N., Walters, R. K., Willoughby, E. A., ... Cesarini, D. (2018). Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. *Nature Genetics*, 50(8), 1112–1121. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0147-3>
- Loughnan, R. J., Palmer, C. E., Thompson, W. K., Dale, A. M., Jernigan, T. L., & Fan, C. C. (2020). *Polygenic Score of Intelligence is More Predictive of Crystallized than Fluid Performance Among Children* (p. 637512). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/637512>
- Matijasevich, A., Pearson, R. M., Loret de Mola, C., Maruyama, J. M., La Maison, C., Munhoz, T. N., Barros, F. C., Santos, I. S., & D Barros, A. J. (2020). Early child stimulation and attention-related executive functions at 11 years: 2004 Pelotas birth cohort study. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 29(9), 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s00787-019-01440-3>
- Maulik, P. K., Mascarenhas, M. N., Mathers, C. D., Dua, T., & Saxena, S. (2011). Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities*, 32(2), 419–436. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2010.12.018>

- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Plomin, R., & Deary, I. J. (2015). Genetics and intelligence differences: Five special findings. *Molecular Psychiatry*, *20*(1), 98–108. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.105>
- Plomin, R., & von Stumm, S. (2018). The new genetics of intelligence. *Nature Reviews Genetics*, *19*(3), 148–159. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.104>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, *81*(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- R Core Team. (2022). *The Comprehensive R Archive Network*. <https://cran.r-project.org/>
- Rask-Andersen, M., Karlsson, T., Ek, W. E., & Johansson, Å. (2021). Modification of Heritability for Educational Attainment and Fluid Intelligence by Socioeconomic Deprivation in the UK Biobank. *The American Journal of Psychiatry*, *178*(7), 625–634. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20040462>
- Santos, I., J D Barros, A., Matijasevich, A., Zanini, R., Cesar, M., Camargo-Figuera, F., Oliveira, I., Colugnati, F., & Victora, C. (2014). Cohort Profile Update: 2004 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. Body composition, mental health and genetic assessment at the 6 years follow-up. *International Journal of Epidemiology*, *43*. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu144>
- Santos, I. S., Barros, A. J. D., Matijasevich, A., Domingues, M. R., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2011). Cohort profile: The 2004 Pelotas (Brazil) birth cohort study.

International Journal of Epidemiology, 40(6), 1461–1468.

<https://doi.org/10.1093/ije/dyq130>

- Santos, I. S., Matijasevich, A., Tavares, B. F., Barros, A. J. D., Botelho, I. P., Lapolli, C., Magalhães, P. V. da S., Barbosa, A. P. P. N., & Barros, F. C. (2007). Validação da Escala de Depressão Pós-natal de Edinburgo (EPDS) em uma amostra de mães da Coorte de Nascimento de Pelotas, 2004. *Cadernos de Saúde Pública*, 23, 2577–2588. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007001100005>
- Sauce, B., & Matzel, L. D. (2018a). The Paradox of Intelligence: Heritability and Malleability Coexist in Hidden Gene-Environment Interplay. *Psychological Bulletin*, 144(1), 26–47. <https://doi.org/10.1037/bul0000131>
- Sauce, B., & Matzel, L. D. (2018b). The paradox of intelligence: Heritability and malleability coexist in hidden gene-environment interplay. *Psychological Bulletin*, 144(1), 26–47. <https://doi.org/10.1037/bul0000131>
- Savage, J. E., Jansen, P. R., Stringer, S., Watanabe, K., Bryois, J., de Leeuw, C. A., Nagel, M., Awasthi, S., Barr, P. B., Coleman, J. R. I., Grasby, K. L., Hammerschlag, A. R., Kaminski, J. A., Karlsson, R., Krapohl, E., Lam, M., Nygaard, M., Reynolds, C. A., Trampush, J. W., ... Posthuma, D. (2018). Genome-wide association meta-analysis in 269,867 individuals identifies new genetic and functional links to intelligence. *Nature Genetics*, 50(7), 912–919. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0152-6>
- Schmitt, N. (2014). Personality and Cognitive Ability as Predictors of Effective Performance at Work. *Annual Review of Organizational Psychology and Organizational Behavior*, 1(1), 45–65. <https://doi.org/10.1146/annurev-orgpsych-031413-091255>

- Schoentgen, B., Gagliardi, G., & Défontaines, B. (2020). Environmental and Cognitive Enrichment in Childhood as Protective Factors in the Adult and Aging Brain. *Frontiers in Psychology*, *11*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyg.2020.01814>
- Tellegen, P. J., & Laros, J. A. (1998). *Snijders-Oomen Nonverbal Intelligence Test SONR 2, 5-7: Manual and Research Report*.
- Tölli, P., Keltikangas-Järvinen, L., Lehtimäki, T., Ravaja, N., Hintsanen, M., Ahola-Olli, A., Pahkala, K., Kähönen, M., Hutri-Kähönen, N., Laitinen, T. T., Tossavainen, P., Taittonen, L., Dobewall, H., Jokinen, E., Raitakari, O., Cloninger, C. R., Rovio, S., & Saarinen, A. (2022). The relationship between temperament, polygenic score for intelligence and cognition: A population-based study of middle-aged adults. *Genes, Brain, and Behavior*, *21*(4), e12798. <https://doi.org/10.1111/gbb.12798>
- Trzaskowski, M., Yang, J., Visscher, P. M., & Plomin, R. (2014). DNA evidence for strong genetic stability and increasing heritability of intelligence from age 7 to 12. *Molecular Psychiatry*, *19*(3), 380–384. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.191>
- Wechsler, D. (2002). Escala de inteligência Wechsler para crianças. *Terceira Edição. Padronização Brasileira: Vera LM Figueiredo. São Paulo. Casa Do Psicólogo*.
- Wechsler, D. (2008). *Wechsler Adult Intelligence Scale—Fourth Edition*.
<https://psycnet.apa.org/doiLanding?doi=10.1037%2Ft15169-000>
- World Bank. (2023). *Brazil | Data*. World Bank Data.
<https://data.worldbank.org/country/BR>

Table 1. Description of the sample and comparison between those included in the sample and the original cohort, according to maternal and child characteristics. 2004 Pelotas Birth Cohort, Brazil

Variables	Included (N=3513)		Total-cohort (N=4231)		p
	N	%	N	%	
Child's sex					0.855*
	Female	1698	48.3	2036	48.1
	Male	1815	51.6	2195	51.8
Child's skin color/Race					0.674*
	White braziliam	2378	67.7	2726	68.1
	Black Brazilians; Other [including mixed-race Brazilians and Asian Brazilians]	1134	32.2	1272	31.8
Family income at birth (quintiles)					0.955*
	1 st (poorest)	345	10.0	402	10.5
	2 nd	522	15.2	578	15.2
	3 rd	789	23.0	876	23.0
	4 th	716	20.9	775	20.4
	5 th (wealthiest)	1052	30.7	1166	30.7
Preterm birth (<37 weeks gestation)					0.156*
	Yes	470	13.38	608	14.52
	No	3042	86.62	3579	85.48
Maternal schooling (years)					0.806*
	≥ 4	525	15.0	654	15.6
	5-8	1451	41.4	1731	41.3
	9	1506	43.2	1801	43.0
Maternal age (years)					0.894*
	≤ 19	666	18.9	799	18.9
	20-34	2366	67.3	2865	67.7
	≥ 35	480	13.6	563	13.3
Number of pregnancies					0.782*
	1	1403	39.9	1665	39.3
	2	929	26.4	1110	26.2
	≥ 3	1181	33.6	1453	34.3
Smoking during pregnancy					0.645*
	Yes	948	26.9	1162	27.4
	No	2565	73.0	3067	72.5
Maternal depression: EPDS ≥10 (at 12 months)					0.853*
	Yes	921	27.3	1059	27.5
	No	2441	72.6	2779	72.4
Early cognitive stimulation score at 24 and 48 months (mean and standard deviation)					0.782**
		3344	3.5 (0.89)	3665	3.53(0.9)
Child's IQ at age 6 (mean and standard deviation)					0.957**

3513	78.5 (15.95)	3519	78.47(15.95)
------	--------------	------	--------------

* p-value referring to Fisher's Exact Test.

** p-value referring to Student's T-test.

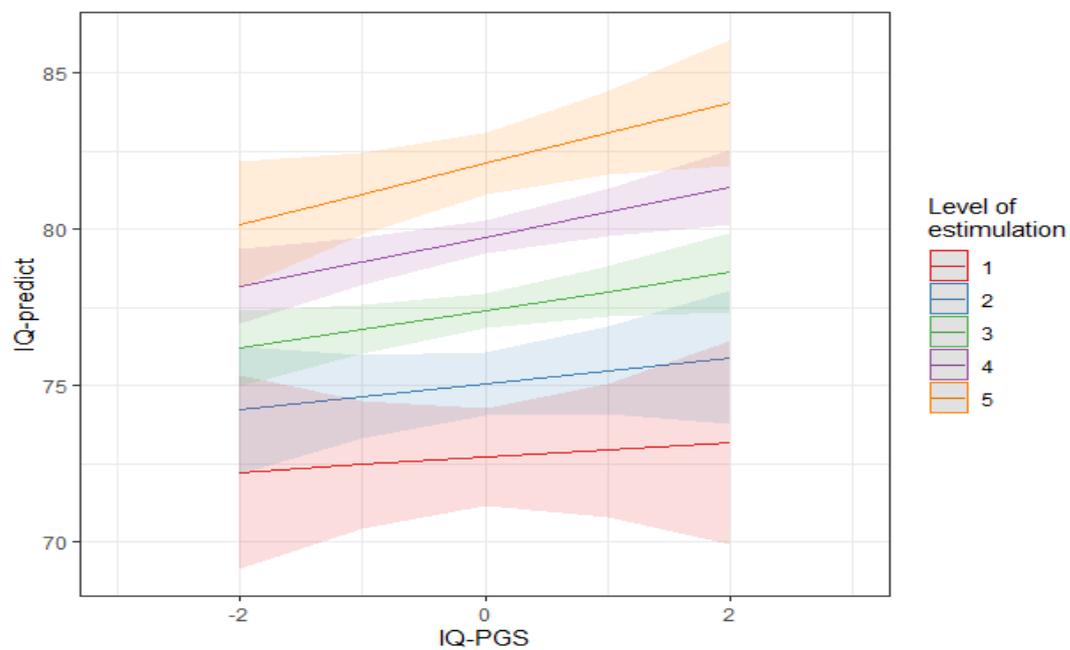
Table 2. Results of the crude and adjusted linear regression models for the association between genetic (IQ-PGS) and environmental (ECS) exposure variable and IQ at the age of 6 years. Pelotas Birth Cohort 2004, Brazil.

Exposure Variables	Crude Model				Adjusted Model			
	N	Beta	95%IC	P	N	Beta	95%IC	P
IQ-PGS*	3329	2.11	1.58 – 2.65	<0.001	3329	0.79	0.26 – 1.31	0.003
ECS**	3344	6.45	5.89 – 7.01	<0.001	3204	2.34	1.76 – 2.92	<0.001

*IQ-PGS: polygenic score for intelligence quotient; linear regression model, sex and the first 10 principal components were included as covariables.

** linear regression model, adjusted for skin color and sex of the child, prematurity, maternal education, Number of pregnancies, maternal smoking during pregnancy, maternal age, Edinburgh scale at 12 months, and total family income.

Fig. 1. Schematic representation of the effect of the interaction between ECS score with IQ-PGS on IQ at the age of 6 years, adjusting for covariates. Each line represents the IQ prediction value according to ECS categories. The shading represents the values of the 95% confidence interval for each row.



Artigo 3

Será submetido para: Psychoneuroendocrinology

Novembro 2023

Association between intellectual disability and hair cortisol concentration in adolescents from a Brazilian population-based birth cohort.

Karen Y. Sánchez-Luquez^{a,1}, Simone Karam de Menezes^{b,2}, Iná S. Santos^{a,1}, Aluisio J D Barros^{a,1}, Andrea Gonzalez^{c,3}, Joseph Murray^{a,d,1}, Isabel O. de Oliveira^{a,1}, Alícia Matijasevich^{e,4}, Iná Santos^{a,1} Luciana Tovo-Rodrigues^{a,d,1}

a Post Graduate Program of Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

b Postgraduate Program in Public Health, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil

c Department of Psychiatry & Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, Canada

d Human Development and Violence Research Centre (DOVE), Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

e Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

* Correspondence to: Luciana Tovo-Rodrigues, Marechal Deodoro, 1160 - 3rd floor. Centro, Pelotas, RS, 96020-220300, Brazil. ksanchezluquez@gmail.com

E-mail addresses: ksanchezluquez@gmail.com (K. Sánchez-Luquez), karam.simone@gmail.com (S. Karam), inasantos.epi@gmail.com (I. Santos), abarros@equidade.org (A. Barros), gonzal74@gmail.com (A. Gonzalez), j.murray@doveresearch.org (J. Murray), isabel.ufpel@gmail.com (I. Oliveira), alicia.matijasevich@usp.br (A. Matijasevich), inasantos.epi@gmail.com (I. Santos), luciana.tovo@gmail.com (L. Tovo-Rodrigues).

Highlights:

- Intellectual Disability (ID) may involve stress response dysfunction in adolescence
- Higher hair cortisol concentration (HCC) was observed in ID individuals compared to neurotypical adolescents
- Alteration in HCC was mainly associated with idiopathic ID etiology

Abstract:

Objective: Children with intellectual disability (ID) usually exhibit neuroendocrine functioning impairment, such as alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) neuroendocrine axis, which can result in glucocorticoid cortisol release alterations. Indeed, many studies observed a positive association between ID and cortisol concentration. However, the literature lacks studies evaluating the relationship between child neurodevelopment and cortisol levels during adolescence in population-based designs. **Methods:** We aimed to test the association between ID with hair cortisol concentration (HCC) during adolescence in a prospective population-based cohort. Data from the 2004 Pelotas Birth Cohort was used. ID was diagnosed at age 6 by clinical examination, and hair cortisol was measured at age 15. Association was assessed using linear regression models adjusted for sex, socioeconomic factors, hair related variables and corticosteroid use **Results:** 1,770 individuals were included in the study. Higher HCC were observed in individuals with ID in the adjusted analysis for sex, hair related variables and corticosteroid use (β :1.120; 95% CI: 1.012, 1.241) and suggesting when socioeconomic factors were taken into account (β : 1.108; 95% CI: 0.999, 1.230). It was more evident for idiopathic ID. **Conclusion:** Our results suggest that children with ID, mainly with idiopathic ID etiology, might have HPA axis or stress response dysfunction during adolescence.

Key-words: Cortisol, intellectual disability, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis

1. Introduction:

Intellectual disability (ID) is one of the most serious Neurodevelopmental Disorders (NDDs) (American Psychiatric Association, 2013) that affects up to 3% of the population worldwide (Maulik *et al.*, 2011). ID has heterogeneous etiology and clinical presentation (Lee *et al.*, 2023). It is defined by impairments in general mental abilities and adaptive behavior beginning before the age of 18 years (Salvador-Carulla *et al.*, 2011). According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition (DSM-5), ID is characterized by deficits in generic mental abilities, such as reasoning, problem solving, planning, abstract thinking, judgment, academic learning, and learning by experience (American Psychiatric Association, 2013). From a psychometric perspective, an intelligence quotient (IQ) score of two standard deviations or more below the population mean is usually characteristic of ID (Salvador-Carulla *et al.*, 2011).

Children with neurological and/or behavioral disorders are known to have impairment neuroendocrine responses (Blomqvist *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2012), as an altered hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which regulates the body's response to stress through its main effector, the glucocorticoid cortisol (Dedovic and Ngiam, 2015; Stalder *et al.*, 2017). Indeed, these groups have already been observed to have higher cortisol concentrations (Hardiman and Bratt, 2016). High cortisol levels may be a cause, a consequence from, or be correlated with ID. High cortisol concentration is predictive of developing and maintaining neurodevelopmental disorders such as ID and/or related endophenotypes in epidemiologic studies, including samples composed by mother-child dyads (Haselbeck *et al.*, 2017; Osborne *et al.*, 2018), children (Wisbeck *et al.*, 2000; Hessel *et al.*, 2006; Saridjan *et al.*, 2014; Andiarana *et al.*, 2017) and adults (Symons *et al.*, 2011;

Presland *et al.*, 2013; Byiers *et al.*, 2020; Lundqvist *et al.*, 2022). Individuals with ID may experience unique stressors and have less support for coping (Lunsky and Benson, 2001; Hastings *et al.*, 2004), this may account for the observed higher cortisol levels. Nevertheless, individuals with NDDs may have abnormal HPA axis functioning comorbid with the behavioral phenotype (Hardiman and Bratt, 2016).

As well as the brain development, the HPA system development and stress regulation are highly impacted by adolescence. Adolescence is characterized by many changes in neuroendocrine, neurodevelopmental, and behavioral systems, as well as in stress reactivity and regulation (McCormick and Mathews, 2010; Engel and Gunnar, 2020). It is also an important period for incidence of mental illness (Kessler *et al.*, 2007), which has been linked to stress and high cortisol levels (Bird *et al.*, 2020, 2020; Dion-Albert *et al.*, 2023). For vulnerable groups, such as those with developmental delay and ID (King *et al.*, 2019), adolescence challenges may be even more difficult. This highlights the complex relationship between cortisol and ID, as well as the need for more studies evaluating the relationship between them during adolescence.

The cause of ID is still the focus of intense debate in literature, since its etiological determination impacts on treatment, genetic counseling, family planning and support, as well as surveillance and implementation of preventive programs. In studies evaluating cortisol, it is common to classify ID only as mild, moderate or profound (McGillivray and McCabe, 2007; Presland *et al.*, 2013), without differentiating it by etiology, or focusing specifically on individuals with ID of a specific genetic etiology. At least 5 etiologic groups have been identified in ID, nonbiologic etiology, genetic etiology, idiopathic etiology, neonatal sequelae etiology, and other disease etiology (Schwartzman and Lederman, 2017a). Studies covering the entire etiologic spectrum of ID from a neurodevelopmental perspective to investigate its association with cortisol are scarce in the literature. Population-based studies can provide a more realistic representation of the prevalence of each etiologic group (Karam *et al.*, 2015).

Finally, cortisol levels, as a marker of HPA axis function or stress regulation, have been associated with ID. The studies conducted to date have reported cortisol concentrations from saliva or blood samples, which are extremely susceptible to circadian variations of the hormone. In this context, cumulative measures of cortisol accumulation, such as in hair (hair cortisol concentration - HCC), could be stable over time and more effective in

assessing chronic stress (Silva and Enumo, 2014). Another pitfall in the current literature regards the reduced sample sizes and the limited number of studies focused on adolescence. Thus, relevant information on the relationship between neurodevelopment, cognition, and HPA could be provided by population-based studies examining the association between ID, DI etiology aspects, and hair cortisol.

This study aims to (i) test whether the ID diagnosed in childhood is associated with increased levels of cortisol and (ii) check whether any specific ID etiology is associated with HCC in adolescents from the 2004 Pelotas Birth Cohort. We hypothesize that ID is related to HPA axis dysregulation or stress response leading to high cortisol levels.

2.Methodology

2.1.Participants:

This study analyzes data from participants of the 2004 Pelotas Birth Cohort. From January 1st to December 31th, 2004, 4,231 live births were recruited from mothers residing in the urban area of the municipality of Pelotas, southern Brazil, representing 99.2% of all births that occurred in the city in that year. A structured questionnaire was used to obtain detailed information on demographic, socioeconomic, behavioral, and biological characteristics, as well as reproductive history, and health care utilization. Participants were assessed at birth (perinatal study), 3, 12, 24, and 48 months, and at 6, 11, 15, and 18 years of age, with follow-up rates of 95.7%, 94.3%, 93.5%, 92.0%, 90.2%, 86.6%, 48.5% and 85.0%, respectively. The detailed methodology of the cohort has been published elsewhere (Santos et al., 2014, 2011). From the 6-year follow-up, a nested cohort was established with the main study of children with suspected ID (see details below).

Besides the information collected during the perinatal, follow-ups at 3, 24 and 48 months were conducted at home, and follow-ups at 6, 11 and 15 years were conducted at the Epidemiological Research Center of the Federal University of Pelotas, a clinic specifically designed to conduct the cohort follow-ups. The 15-year follow-up data collection was planned to take place from October 2019 to July 2020. Nonetheless, due to the COVID-19 pandemic, follow-up was suspended in March 2020, when the study was halfway complete. Participants with valid hair cortisol data assessed at 15 years and ID diagnosis at age 6 were included in the present study.

2.2. Hair Cortisol

Hair sample for cortisol quantification was collected by a trained and standardized field worker following detailed instructions (Martins *et al.*, 2023). Hair strands were collected from the vertex of the participant's head, as close to the scalp as possible, identified, and stored until processing. Washing, grinding, hormone extraction, and cortisol quantification were performed according to protocol (Claire Buchan *et al.*, 2021), in the laboratory of the Postgraduate Program in Epidemiology at the Federal University of Pelotas. The procedures are described in detail elsewhere (Martins *et al.*, 2023). After hair cortisol extraction, samples were suspended in 150 μ l of assay diluent for 24 hours and then tested in duplicate by ELISA technique using the Salivary Cortisol High Sensitivity Immunoassay Kit (Cat# 1-3002, Salimetrics, Pennsylvania) according to the manufacturer's instructions. The ELISA plate reader SpectraMax®190 (Molecular Devices, U.S) was used for cortisol detection. The intra- and inter-assay coefficients of variation were <10%. Cortisol concentrations are expressed in pg/mg. Outliers, corresponded to values 4 standard deviations (SD) away from the HCC mean using raw data, were eliminated from the analytical sample. Ten values were eliminated. After that, due to the right-tailed nature of the curve, the cortisol concentration values were transformed to the natural logarithm of the concentration (ln) in order to be included in the regression models.

2.3. Intellectual Disability (ID)

ID information was obtained from a cohort study nested within the main cohort, based on follow-up data at 4 years of age, children with global developmental delay and suspected ID, were re-evaluated at the clinic at 6 years of age and, if applicable, given a diagnosis of ID. In this sub-study, anamnesis, physical examination, and screening for impairments in adaptive behavior were they were applied, in addition to laboratory and molecular tests. From a psychometric point of view, IQ data collected at 4 and 6 years of age by the Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence (WPPSI) and Wechsler Intelligence Scale for Children-III (WISC-III) scales were used respectively (Wechsler, 1983, 1992). This subsample is still currently followed-up (Karam *et al.*, 2015, 2016). Of the 214 individuals with suspected ID at 4 years old, 150 were confirmed and categorized according to etiological group into: non-biological; genetic; idiopathic; neonatal sequelae and other diseases (Karam *et al.*, 2016). Among those, 86 were eligible for this study because had valid HCC information. The presence of ID was considered as a dichotomous variable (yes or no). As a secondary analysis the ID etiological group

(nonbiological; genetic; idiopathic; neonatal sequelae; and other diseases) were also used as exposure to assess differences among groups.

2.4.Covariates:

The final model included participant's sex (male or female), skin color referred by the mother (categorized as white, non-white), and family income at birth (quintiles adjusted to the minimum wage of the study population) as socioeconomic potential confounding variables. At age 15, the covariables included in the study were hair type (straight, wavy, curly, and kinky), hair color (black, brown, red, and blonde), hair washing frequency at week (≤ 3 times, 4-6 times, ≥ 7 times), and corticosteroid use in the past 3 months (yes or no), due to the high degree of cross-reactivity with dexamethasone reported for Salimetrics kit used to measure cortisol in our study (Martins et al., 2023).

2.5.Statistical analysis

Normal distribution of continuous variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Descriptive analyses [means, Standard Deviation (SD), percentages] were used to report the characteristics of the sample studied. Bivariate analyses were tested by linear regression models.

Different linear regression models were used to test the association between ID and HCC: (a) crude model, (b) model 1, which include sex variable and those associated with HCC (natural color, hair type and hair washing frequency, and corticoid use in the last 3 months, as adjustment, and (c) model 2, which included model 1 plus socioeconomic determinants (skin color and family income at birth).

In order to evaluate possible differences in HCC regarding the physiological origin of ID (Katz and Lazcano-Ponce, 2008), an additional analysis was performed, in which the etiological groups were used as exposure variable for each model.

The results were expressed as Beta coefficient (β) of the regression, its 95% confidence interval (95% CI) and p-value (p). To present the results, the coefficients were back-transformed by exponentiation and interpreted as geometric means because the HCC variable was ln transformed to be included as an outcome in the linear regression as

suggested in previous studies (Martins *et al.*, 2023). We considered statistically significant when $p < 0.05$. All data analyses were analyzed in STATA 15 (“Stata/SE,” 2017).

2.6.Ethical

All follow-up assessments of the 2004 Pelotas Birth Cohort were approved by the Research Ethics

Committee from Medical School of the Federal University of Pelotas. All mothers or guardians of participating children signed an informed consent form before data collection.

3.Results:

3.1.Sample Characteristics

A total of 1,770 participants were included in the analyses. Individual characteristics of the group included in the analysis as well as the total participants (N=4,231) are presented in Table 1. The median hair cortisol was 3.7 pg/mg (Interquartile ranges- IQR 0.29 to 104.92 pg/mg). After ln transformation, the mean HCC was 1.31 ln(pg/mg) (SD: 0.45). A total of 86 individuals with ID were included in the study (Table 1). Among them, 37.2% (N=32) had nonbiological etiology, 19.7% (N=17) the genetic etiology; 18.6% (N=16) idiopathic etiology; 15.2% (N=13) neonatal sequelae etiology; and 9.3% (N=8) other diseases etiology.

The mean age of the participants was 15.7 years (SD=0.2). Of the total sample included in the study, 51.1% were female, 70.0% were white Brazilians, and 9.2% of the children belonged to the lowest and 33.4% to the highest income quintile.

Corticoids usage was reported by 11.5% of the participants at age 15. Regarding hair characteristics, the most frequent hair type was straight (37.1%), followed by wavy (32%), curly (19.4%), and kinky (11.5%). Regarding hair color, the most frequent was brown (61.2%), followed by black (32.3%), blonde (5.8%), and lastly, red hair (0.6%). Washing the hair more than 7 times a week was reported by 52.8% of the adolescents. There was a slight predominance of girls (51.1 vs 48.9%) in the analyzed group when compared to the total cohort sample (table 1).

3.2.Determinants of cortisol levels: bivariate analysis

Table 2 shows the results of the bivariate tests between the covariates and HCC. We found that girls had an average of 8% less HCC than did boys (β :0.922, 95% CI 0.884;0.961, p <0.001). Regarding hair characteristics, the wavy (β :0.943, 95%CI 0.897;0.991, p =0.021) and kinky (β :0.885, 95%CI:0.825; 0.950, p =0.001) hair types showed lower HCC means (6% and 11%, on average respectively) when compared to the straight type. Blonde hair color was associated with 13% lower HCC mean (β :0.869, 95% CI: 0.792; 0.954, p =0.003), compared to black hair color. Among income quintiles, lower cortisol levels were present in individuals in the 2nd quintile when compared to the poorest quintile, a 9% decrease in mean cortisol concentration (β :0.912, 95%CI:0.857, 0.970, p =0.040).

3.3. Association between ID and HCC:

Table 3 presents the association results between ID and HCC for the crude and adjusted models. In the crude model, we observed a borderline significant association between ID and HCC (β :1.099, 95% CI: 0.997;1.210, p =0.055). When adjusted for sex, hair characteristics, and corticosteroid use, the association was evidenced between the presence of ID and an increase in the mean of 12% in HCC (Model1: β : 1.120, 95% CI: 1.012; 1.241, p = 0.028). However, when the socioeconomic variables were included, there was a subtle attenuation the regression coefficient, wich had similar magnitude of association, but with wider confidence interval (Model2: β : 1.108, 95% CI: 0.999; 1.230, p = 0.052).

Regarding specific etiologies, idiopathic ID group showed statistically significant positive association with HCC in both crude and model1. This represents an average increase in HCC of 29% (crude model: β : 1.291; 95% CI: 1.036, 1.608; $p_{\text{idiopathic}}$ =0.023) and 28% (model 1: β : 1.280; 95% CI: 1.004, 1.631; $p_{\text{idiopathic}}$ =0.046), respectively, when compared with non-ID individuals. After adjustment for socioeconomic factors, the magnitude of the effect was similar between models, but the significance was attenuated (Table 3).

4. Discussion:

The present study evaluated the association of children neurodevelopment and HCC during adolescence in a Brazilian population-based birth cohort. Our results suggest that

ID, mainly with idiopathic etiology, might be associated with increased HCC in adolescence.

HPA axis is an important target in stress and developmental studies (Engel and Gunnar, 2020). Our results suggest a possible association between the presence of ID and higher HCC for some tested models. Although this association did not remain significant for every tested models, the magnitude of the effect among the models tested was similar. The lack of power of our analyses could highly have impacted the results. As reported in other studies, higher cortisol levels have been associated with ID (Wisbeck *et al.*, 2000; Hessler *et al.*, 2002, 2002) and/or with the presence of endophenotypes associated with this condition (Symons *et al.*, 2011; Presland *et al.*, 2013; Byiers *et al.*, 2020; Lundqvist *et al.*, 2022). Some studies exploring interventions aimed at reducing cortisol levels in ID patients. A randomized controlled trial evaluated cortisol levels in 34 adults with profound intellectual multiple disability, a profound ID and physical disabilities with a high level of multimorbidity, to evaluate the efficacy of activities aimed at offering relaxation, reducing stress as a strategy to decrease salivary cortisol levels, which was significantly decreased after the intervention (Lundqvist *et al.*, 2022). Moreover, adults with ID have shown a significant positive correlation between cortisol and anxiety (Presland *et al.*, 2013), chronic self-injurious behavior (Symons *et al.*, 2011), and depressive symptoms (Hamers *et al.*, 2021), suggesting an important role for the HPA axis in ID patients, consistent with our findings. Another study, multicenter randomized controlled trial investigating the effect of bright light therapy (BLT) on depressive symptoms in 41 adults with ID, a decrease in depressive symptoms was seen (Hamers *et al.*, 2020). The mechanism of functioning is not fully understood, but previous research has shown that BLT influences cortisol concentrations (Hamers *et al.*, 2021). Our results could open a new window to explore these interventions, linked to a health-promoting activity, even in adolescence and enhance improvements in the adult condition.

Previous studies, etiology-related aspects, find that individuals with fragile X syndrome (FXS) or Rett syndrome (RTT) syndrome have higher cortisol levels compared to controls (Wisbeck *et al.*, 2000; Hessler *et al.*, 2002; Byiers *et al.*, 2020). Other studies, focus on HPA axis activity specifically in genetic ID, such as FXS, the most commonly known cause of inherited intellectual disability, or RTT, a severe neurodevelopmental disorder resulting from mutations in the MECP2 gene. Evaluating diurnal cortisol measurements, Wisbeck *et al.* found that 7 women and 8 men (aged 6 to 25 years) with FXS syndrome had higher

cortisol levels compared to a normative sample (Wisbeck *et al.*, 2000). Hessler *et al.* conducted a larger study of 39 women and 70 men with FXS syndrome (aged 6-17 years) and found higher cortisol levels in them compared to siblings without FXS syndrome (58 women, 51 men; aged 6-17 years) (Hessler *et al.*, 2006). In another study, 30 women with RTT were found to have aberrant HPA axis function and suggest that this risk could be mediated by the type of mutation present (Byiers *et al.*, 2020), which demonstrates the etiological complexity of ID and the importance of elucidating the effect of cortisol on ID condition. Our results, found no significant association between HCC and genetic ID, considering that our genetic etiologic group, includes individuals who have various types of genetic disorders (Karam *et al.*, 2015). Therefore, it was not possible to assess the association within the group and differentiate by different genetic causes due to the sample size of the group. In our study, when etiological groups were considered, we observed that there was a positive association between increased cortisol concentration in the group whose etiology was classified as idiopathic. In individuals with idiopathic ID, the cause may not be apparent or characterized (Karam *et al.*, 2016; Schwartzman and Lederman, 2017b). These children present syndromic features, such as dysmorphisms and abnormal behavior, with normal laboratory tests and inconclusive clinical evaluation. Given these results, new perspectives on the pathophysiology of this clinical form of ID, could be explored, including HPA axis dysregulation as a possible therapeutic or intervention factor.

We examined the associations between hair cortisol and covariates previously reported in the literature as possible confounders. This has been rarely done in other studies. Sex, income, hair type, and hair color were found to be associated with HCC. Consistent with the literature, we observed male sex associated with increased HCC (Stalder *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2023). Our results suggest that lower income, indicating greater social vulnerability, is associated with higher chronic stress, as previously reported (Brown *et al.*, 2019; Bates *et al.*, 2021). Regarding the influence of hair characteristics on cortisol measurements, our results suggest that hair type and color may be important and should be considered in future studies. Rippe, *et al.* found a significant positive association between HCC and darker hair color (Rippe *et al.*, 2016), which is consistent with our findings. However, previous studies have not found an association between such characteristics (Milam *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2023).

The results should be interpreted in the context of some limitations. Due to COVID-19 pandemic, the follow-up rate in the cohort was particularly low, in contrast to previous ones. This generated a small sample of cases, this may have affected the statistical power to detect small effect associations and increased the imprecision of confidence interval of the association with ID in the adjusted models. Even though HCC could be considered a potential measure of chronic stress (Milam *et al.*, 2014), the assessed hair cortisol reflects the bioaccumulation of the three months previous the collection. Therefore, we cannot conclude that the observed stress levels are the same over time.

To our knowledge, this is the first population-based study evaluating HCC in adolescents with a relatively large sample size. Obtaining cortisol from hair allows access to long-term accumulated cortisol in a single collection, reducing the error rate in sample processing in the laboratory and allowing a higher degree of comparability among individuals included in the study (Silva and Enumo, 2014). Furthermore, in addition to being a quantitative measure, hair cortisol allows for the assessment of stress in individuals with more severe ID, as self-report of perceived stress would not be possible in these individuals. We examined the associations between hair cortisol and several possible characteristics as confounders. The group of participants with ID was successively evaluated and a thorough investigation was carried out, allowing the identification of different etiological groups, which represents a great opportunity to evaluate the possible relationship between cognitive impairments and cortisol levels, as well as their possible relationship with the pathophysiology of this condition.

5. Conclusions:

Our findings suggest that individuals with ID might have higher HCC, suggesting an dysfunction in HPA axis functionality or stress response. Amongst etiological groups, high cortisol concentration was associated with the idiopathic cause of ID. Therefore, mechanisms during development must influence the HPA axis and the stress response. Further population-based studies during adolescence are recommended to confirm our findings.

Funding

This article is based on data from the study "Pelotas Birth Cohort, 2004" conducted by Postgraduate Program in Epidemiology at Universidade Federal de Pelotas, with the collaboration of the Brazilian Public Health Association (ABRASCO). From 2009 to 2013, the Wellcome Trust supported the 2004 birth cohort study. The World Health Organization, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), Brazilian National Research Council (CNPq), Brazilian Ministry of Health, and Children's Pastorate supported previous phases of the study. São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant no. 2014/13864-6 e Grant no. 2020/07730-8). The 15-year follow-up was funded by the Department of Science and Technology of the Brazilian Ministry of Health (DECIT). CNPq supports LTR (grant number 308319/2021-4). Wellcome Trust supports JM (grant number 210735_A_18_Z), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001. For the purpose of open access, the author has applied a CC BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript version arising from this submission.

Acknowledgments

The authors would like to thank the cohort participants and their families, as well as the administrative and field staff, who collaborated in the various assessments of the 2004 Pelotas Birth Cohort study.

Disclosure Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

References:

American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fifth Edition. American Psychiatric Association. Available at: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>.

- Andiarena, A. *et al.* (2017) 'Evening salivary cortisol and alpha-amylase at 14months and neurodevelopment at 4years: Sex differences.', *Hormones and behavior*, 94, pp. 135–144. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.07.008>.
- Bates, R.A. *et al.* (2021) 'Sociodemographics and chronic stress in mother-toddler dyads living in poverty', *Developmental Psychobiology*, 63(6), p. e22179. Available at: <https://doi.org/10.1002/dev.22179>.
- Bird, W. *et al.* (2020) 'Reducing chronic stress to promote health in adults: the role of social prescriptions and social movements', *Journal of the Royal Society of Medicine*, 113(3), pp. 105–109. Available at: <https://doi.org/10.1177/0141076819890547>.
- Blomqvist, M. *et al.* (2007) 'Salivary cortisol levels and dental anxiety in children with attention deficit hyperactivity disorder', *European Journal of Oral Sciences*, 115(1), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2007.00423.x>.
- Brown, E.D. *et al.* (2019) 'Economic instability and household chaos relate to cortisol for children in poverty', *Journal of family psychology: JFP: journal of the Division of Family Psychology of the American Psychological Association (Division 43)*, 33(6), pp. 629–639. Available at: <https://doi.org/10.1037/fam0000545>.
- Byiers, B.J. *et al.* (2020) 'Associations Among Diurnal Salivary Cortisol Patterns, Medication Use, and Behavioral Phenotype Features in a Community Sample of Rett Syndrome', *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, 125(5), pp. 353–368. Available at: <https://doi.org/10.1352/1944-7558-125.5.353>.
- Claire Buchan, M. *et al.* (2021) 'Hair Cortisol and Health-Related Quality of Life in Children with Mental Disorder', *Chronic Stress*, 5, p. 24705470211047885. Available at: <https://doi.org/10.1177/24705470211047885>.

- Dedovic, K. and Ngiam, J. (2015) 'The cortisol awakening response and major depression: examining the evidence', *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, pp. 1181–1189. Available at: <https://doi.org/10.2147/NDT.S62289>.
- Dion-Albert, L. *et al.* (2023) 'Neurovascular adaptations modulating cognition, mood, and stress responses', *Trends in Neurosciences*, 46(4), pp. 276–292. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.01.005>.
- Engel, M.L. and Gunnar, M.R. (2020) 'The development of stress reactivity and regulation during human development', *International Review of Neurobiology*, 150, pp. 41–76. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.11.003>.
- Hamers, P.C.M. *et al.* (2020) 'The effect of bright light therapy on depressive symptoms in adults with intellectual disabilities: Results of a multicentre randomized controlled trial', *Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities*, 33(6), pp. 1428–1439. Available at: <https://doi.org/10.1111/jar.12770>.
- Hamers, P.C.M. *et al.* (2021) 'Hair glucocorticoids in adults with intellectual disabilities and depressive symptoms pre- and post-bright light therapy: First explorations', *Journal of applied research in intellectual disabilities: JARID*, 34(6), pp. 1549–1559. Available at: <https://doi.org/10.1111/jar.12899>.
- Hardiman, R.L. and Bratt, A. (2016) 'Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in Fragile X Syndrome and its relationship to behaviour: A systematic review', *Physiology & Behavior*, 167, pp. 341–353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.030>.
- Haselbeck, C. *et al.* (2017) 'Prenatal maternal distress seems to be associated with the infant's temperament and motor development: an explorative study.', *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 124(7), pp. 881–890. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1712-0>.

- Hastings, R.P. *et al.* (2004) 'Life events and psychiatric symptoms in adults with intellectual disabilities', *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 48(1), pp. 42–46. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2004.00584.x>.
- Hessl, D. *et al.* (2002) 'Cortisol and behavior in fragile X syndrome', *Psychoneuroendocrinology*, 27(7), pp. 855–872. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(01\)00087-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(01)00087-7).
- Hessl, D. *et al.* (2006) 'Social behavior and cortisol reactivity in children with fragile X syndrome', *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 47(6), pp. 602–610. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2005.01556.x>.
- Karam, S.M. *et al.* (2015) 'Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: A population-based study', *American Journal of Medical Genetics. Part a*, 167(6), pp. 1204–1214. Available at: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37011>.
- Karam, S.M. *et al.* (2016) 'Intellectual Disability in a Birth Cohort: Prevalence, Etiology, and Determinants at the Age of 4 Years', *Public Health Genomics*, 19(5), pp. 290–297. Available at: <https://doi.org/10.1159/000448912>.
- Katz, G. and Lazcano-Ponce, E. (2008) 'Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis', *Salud Publica De Mexico*, 50 Suppl 2, pp. s132-141. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0036-36342008000800005>.
- Kessler, R.C. *et al.* (2007) 'Age of onset of mental disorders: a review of recent literature', *Current Opinion in Psychiatry*, 20(4), pp. 359–364. Available at: <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32816ebc8c>.

- King, T.L. *et al.* (2019) 'Mental health of adolescents: variations by borderline intellectual functioning and disability.', *European child & adolescent psychiatry*, 28(9), pp. 1231–1240. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00787-019-01278-9>.
- Li, Y. *et al.* (2023) 'Associations between chronic stress and hair cortisol in children: A systematic review and meta-analysis', *Journal of Affective Disorders*, 329, pp. 438–447. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2023.02.123>.
- Lundqvist, L.-O. *et al.* (2022) 'Salivary cortisol levels and stress in adults with profound intellectual and multiple disabilities participating in the Structured Water Dance Intervention: a randomised controlled crossover trial', *Scientific Reports*, 12(1), p. 17418. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21573-x>.
- Lunsky, Y. and Benson, B.A. (2001) 'Association between perceived social support and strain, and positive and negative outcome for adults with mild intellectual disability', *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 45(Pt 2), pp. 106–114. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2788.2001.00334.x>.
- Martins, R.C. *et al.* (2023) 'Determinants of hair cortisol in preschool children and their mothers: A Brazilian birth cohort study', *Psychoneuroendocrinology*, 150, p. 106027. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2023.106027>.
- Maulik, P.K. *et al.* (2011) 'Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies', *Research in Developmental Disabilities*, 32(2), pp. 419–436. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2010.12.018>.
- McCormick, C.M. and Mathews, I.Z. (2010) 'Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), pp. 756–765. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.09.019>.

- McGillivray, J.A. and McCabe, M.P. (2007) 'Early detection of depression and associated risk factors in adults with mild/moderate intellectual disability', *Research in Developmental Disabilities*, 28(1), pp. 59–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2005.11.001>.
- Milam, J. *et al.* (2014) 'Hair Cortisol, Perceived Stress and Dispositional Optimism: A Pilot Study among Adolescents', *Journal of Traumatic Stress Disorders & Treatment*, 3(3), p. 1000126. Available at: <https://doi.org/10.4172/2324-8947.1000126>.
- Osborne, S. *et al.* (2018) 'Antenatal depression programs cortisol stress reactivity in offspring through increased maternal inflammation and cortisol in pregnancy: The Psychiatry Research and Motherhood - Depression (PRAM-D) Study.', *Psychoneuroendocrinology*, 98, pp. 211–221. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.06.017>.
- Presland, A.D. *et al.* (2013) 'Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity in adults with intellectual disabilities: a preliminary investigation.', *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 57(6), pp. 539–551. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2012.01557.x>.
- Rippe, R.C.A. *et al.* (2016) 'Splitting hair for cortisol? Associations of socio-economic status, ethnicity, hair color, gender and other child characteristics with hair cortisol and cortisone', *Psychoneuroendocrinology*, 66, pp. 56–64. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.12.016>.
- Salvador-Carulla, L. *et al.* (2011) 'Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for “mental retardation/intellectual disability” in ICD-11', *World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association*

- (*WPA*), 10(3), pp. 175–180. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2011.tb00045.x>.
- dos Santos, M.J.P. *et al.* (2012) ‘Salivary alpha amylase and cortisol levels in children with global developmental delay and their relation with the expectation of dental care and behavior during the intervention.’, *Research in developmental disabilities*, 33(2), pp. 499–505. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2011.10.015>.
- Saridjan, N.S. *et al.* (2014) ‘Diurnal cortisol rhythm and cognitive functioning in toddlers: the Generation R Study.’, *Child neuropsychology: a journal on normal and abnormal development in childhood and adolescence*, 20(2), pp. 210–229. Available at: <https://doi.org/10.1080/09297049.2013.763921>.
- Schwartzman, J.S. and Lederman, V.R.G. (2017a) ‘Deficiência intelectual: causas e importância do diagnóstico e intervenção precoces’, *Inclusão Social*, 10(2). Available at: <https://revista.ibict.br/inclusao/article/view/4028> (Accessed: 16 May 2023).
- Schwartzman, J.S. and Lederman, V.R.G. (2017b) ‘Deficiência intelectual: causas e importância do diagnóstico e intervenção precoces’, *Inclusão Social*, 10(2). Available at: <http://revista.ibict.br/inclusao/article/view/4028> (Accessed: 29 November 2020).
- Silva, A.M.B. da and Enumo, S.R.F. (2014) ‘Estresse em um fio de cabelo: revisão sistemática sobre cortisol capilar’, *Avaliação Psicológica*, 13(2), pp. 203–211.
- Stalder, T. *et al.* (2017) ‘Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis’, *Psychoneuroendocrinology*, 77, pp. 261–274. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.12.017>.

- Symons, F.J. *et al.* (2011) 'Salivary biomarkers of HPA axis and autonomic activity in adults with intellectual disability with and without stereotyped and self-injurious behavior disorders.', *Journal of neurodevelopmental disorders*, 3(2), pp. 144–151. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11689-011-9080-9>.
- Wechsler, D. (1983) *Teste de inteligencia para preescolares (WPPSI)*. Translated and Adapted by Permission. Copyright 1963,1967 by the Psychological Corporation. New York, N.Y. USA. All rights reserved /Traducido y adaptado con permiso. Copyright 1983 de esta edición en Castellano by Editorial Paidós, Defensa 59-1er. piso, Buenos Aires.
- Wechsler, D. (1992) *Wechsler Intelligence Scale for Children*. San Antonio TX, Psychological Corp., Harcourt Brace 1992. Third edition.
- Wisbeck, J.M. *et al.* (2000) 'Cortisol and social stressors in children with fragile X: a pilot study', *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*, 21(4), pp. 278–282. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004703-200008000-00004>.

Table 1: Description of the included participants at age 15 years (n=1,770) according to maternal, participants and familiar variables and comparison with original cohort, according to the same characteristics. 2004 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variables	Categories	Included (N=1,770)	Total cohort (N=4,231)	p
Participant's sex (%)	Male	866 (48.9)	2195 (51.9)	0.039
	Female	904 (51.1)	2036 (48.1)	
Participant's skin color (%)	White Brazilian	1239 (70.0)	2726 (68.2)	0.175
	Non-white Brazilians*	531 (30.0)	1272 (31.8)	
Family income at birth (quintiles) (%)	1 st poorest	162 (9.2)	402 (10.6)	0.078
	2 nd	254 (14.4)	578 (15.2)	
	3 rd	377(21.3)	876 (23.1)	
	4 th	385 (21.8)	775(20.4)	
	5 th wealthiest	590 (33.4)	1166(30.7)	
Presence of intellectual disability (%)		86 (4.86)	150 (3.95)	0.116
HCC (pg/mg) at age 15 (median and IQR)		3.7 (0.29- 104.92)	-	-
Hair type (%)	Straight	654 (37.1)	-	
	Wavy	565 (32.0)	-	
	Curly	342 (19.4)	-	
	Kinky	203 (11.5)	-	
Natural hair color (%)	Black	570 (32.3)	-	
	Brown	1080 (61.2)	-	
	Blonde	103 (5.8)	-	
	Red	11 (0.6)	-	
Hair washing frequency (%)	≤ 3 times	395 (22.4)	-	
	4-6 times	438 (24.8)	-	
	≥ 7 times	931 (52.8)	-	
Any corticosteroid use (last 3 months) at age 15 (%)	Yes	190 (11.5)	-	
	No	1465 (88.5)	-	

* Non-white Brazilians, black and other, including mixed-race Brazilians and Asian Brazilians.

Table 2: Bivariate association between covariables included in the study and the HCC ln(pg/mg) at age 15 years using linear regression. 2004 Pelotas Birth Cohort Study, Brazil.

Variables (N)	Categories	Exp(Beta)	95% CI	p
Participant's sex (N=1770)	Male	<i>Ref.</i>		
	Female	0.922	0.884-0.961	<0.001
Participant's skin color (N=1770)	White Brazilian	<i>Ref.</i>		
	Non-white Brazilians*	0.974	0.930-1.019	0.258
Family income at birth (quintiles) (N=1768)	1 st poorest	<i>Ref.</i>		
	2 nd	0.912	0.857-0.970	0.040
	3 rd	1.015	0.958-1.076	0.707
	4 th	0.935	0.883-0.991	0.109
	5 th wealthiest	1.000	0.947-1.056	0.991
Hair type (N=1764)	Straight	<i>Ref.</i>		
	Wavy	0.943	0.897-0.991	0.021
	Curly	0.949	0.896-1.006	0.081
	Kinky	0.885	0.825-0.950	0.001
Natural hair color (N=1764)	Black	<i>Ref.</i>		
	Brown	0.956	0.913-0.999	0.050
	Blonde	0.869	0.792-0.954	0.003
	Red	0.982	0.752-1.281	0.891
Hair washing frequency (N=1764)	≤ 3 times	<i>Ref.</i>		
	4-6 times	1.014	0.954-1.077	0.662
	≥ 7 times	1.041	0.988-1.097	0.135
Any corticosteroid use (last 3 months) at age 15 (N=1655)	Yes	<i>Ref.</i>		
	No	1.020	0.954-1.091	0.561

* Non-white Brazilians, black and other, including mixed-race Brazilians and Asian Brazilians.

Table 3: Results of linear regression models testing the association of ID, and ID etiology, with HCC ln(pg/mg) at age 15. 2004 Pelotas Birth Cohort Study, Brazil.

Association tested	Exposure variable	Crude (N=1770)	p	Model 1 (N=1649) Beta [195%CI]	p	Model 2 (N=1647) Beta [195%CI]	p
ID vs HCC	Neurotypical individuals	Ref.		Ref.		Ref.	
	Presence of ID	1.099 [0.997,1.210]	0.055	1.120 [1.012, 1.241]	0.028	1.108 [0.999, 1.230]	0.052
ID etiology vs HCC	Neurotypical individuals	Ref.		Ref.		Ref.	
	ID with genetic etiology	1.093 [0.883,1.353]	0.411	1.162 [0.920, 1.468]	0.207	1.163 [0.921, 1.469]	0.204
	ID with idiopathic etiology	1.291[1.036, 1.608]	0.023	1.280 [1.004, 1.631]	0.046	1.183 [0.918, 1.524]	0.193
	ID with neonatal sequelae etiology	1.001 [0.784, 1.277]	0.991	0.975 [0.758, 1.254]	0.845	0.979 [0.761, 1.259]	0.872
	ID with other diseases	1.222 [0.896, 1.666]	0.204	1.206 [0.885, 1.643]	0.234	1.210 [0.885, 1.648]	0.226
	ID with non-biological etiology	1.028 [0.879, 1.202]	0.724	1.077 [0.915, 1.267]	0.369	1.083 [0.919, 1.277]	0.338

Model 1: Crude model + sex, natural hair color, hair type, hair washing frequency, any corticosteroid use (last 3 months).

Model 2: Model 1 + skin color, income at birth.

V. COMUNICADO À IMPRENSA

Pesquisa avalia efeito de genética, estimulação infantil e estresse sobre QI e deficiência intelectual em crianças e adolescentes

Fatores biológicos -como os genes-, e ambientais -como a estimulação e o estresse-, contribuem desde o início da vida para guiar o desenvolvimento do indivíduo. A deficiência intelectual (DI) é um distúrbio grave do desenvolvimento do cérebro que apresenta um desafio significativo para a saúde pública. Para aprimorar a prevenção, o diagnóstico oportuno e melhorar a qualidade de vida destes indivíduos, se requer um melhor entendimento de suas causas e possíveis fatores de risco. Pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas realizaram um estudo abrangente, abordando a influência de aspectos genéticos, estímulos precoces e exposição ao estresse crônico sobre a DI e a inteligência de crianças e adolescentes, acompanhados desde o nascimento em 2004, na cidade de Pelotas, no Sul do Brasil.

A pesquisa envolveu dois artigos principais e uma revisão sistemática, desenvolvidos em tese de doutorado da acadêmica Karen Sánchez-Luquez, sob a orientação das docentes Luciana Tovo-Rodrigues e Simone Karam.

Um dos artigos avaliou o impacto de fatores genéticos e ambientais (estimulação cognitiva e social da criança) sobre a inteligência infantil, além de examinar a interação entre esses fatores como potenciais modificadores do Quociente de Inteligência (QI). Os resultados mostraram que tanto os estímulos precoces quanto o perfil genético têm influência positiva sobre o QI, no entanto, não houve interação entre os fatores genéticos e ambientais na inteligência. Esses achados sugerem que os estímulos precoces não modificam de forma significativa o impacto do potencial genético no desenvolvimento intelectual durante a infância, porém estes fatores exercem efeitos independentes sobre os níveis de QI das crianças.

“As descobertas oferecem evidências que contribuem para uma melhor compreensão sobre a influência da genética e do ambiente na inteligência das crianças, destacando a importância de ações direcionadas à estimulação cognitiva e social de crianças em populações socioculturalmente vulneráveis”, diz a autora.

Em um segundo artigo, os pesquisadores analisaram a possível relação entre estresse crônico em jovens com deficiência intelectual em comparação com jovens sem a condição. Os resultados sugerem que adolescentes com deficiência intelectual apresentaram concentrações mais elevadas do hormônio do estresse (cortisol) depositado no cabelo. Entretanto, a autora ressalta que o estudo precisaria de mais participantes, para ter uma evidência mais conclusiva. Os achados representam um avanço na compreensão dos mecanismos subjacentes à relação entre a deficiência intelectual e o estresse, abrindo novas perspectivas para possíveis intervenções terapêuticas.

“Nosso estudo aponta para a necessidade de avaliar intervenções direcionadas à redução dos níveis de cortisol nos adolescentes com deficiência intelectual. Pesquisas anteriores mostraram que atividades de relaxamento e redução do estresse podem diminuir os níveis de cortisol em adultos com deficiência intelectual, contribuindo para o bem-estar dessa população”, comenta Sánchez.

Para complementar a condução desses estudos, os autores realizaram uma ampla revisão sistemática de dados disponíveis na literatura científica, analisando a proporção de casos de deficiência intelectual causados por alterações genéticas. Ao final, o grupo apontou perfis genéticos que estão consolidados como causadores de deficiência intelectual e identificou alguns que requerem mais estudos para confirmar essa relação de causa, fornecendo subsídios valiosos para aperfeiçoar estratégias de diagnóstico. Além disso, foram destacadas vias genético-biológicas promissoras, que apontam para futuras investigações sobre as origens da deficiência intelectual.

Os achados dessa pesquisa apresentam relevância significativa para a saúde pública, pois foram baseados em dados robustos obtidos de uma coorte populacional brasileira, considerando tanto os aspectos genéticos quanto os comportamentais de forma rigorosamente científica. Essas informações, muitas vezes negligenciadas na literatura, contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos subjacentes à inteligência e/ou deficiência intelectual no início da vida.

ANEXO A:

Abstracts

A high value is characterized by: composure, energy, tension, frustration. To our surprise, in this case, carriers of the "TT" genotype had, on average, lower values of the factor (5.3 +/- 0.3) compared to carriers of the "CC" + "CT" genotypes (6.1 +/- 0.2). Polymorphic variant rs1031381 earlier GWAS showed an association with neuropsychological tests [Seshadri S. et al. 2007].

NCAPD3 is 1 of 3 non-SMC subunits that define condensin II (Ono et al., 2003 [PubMed 14532007]). Condensin complexes I and II play essential roles in mitotic chromosome assembly and segregation. Both condensins contain 2 invariant structural maintenance of chromosome (SMC) subunits, SMC2 (MIM 605576) and SMC4 (MIM 605575), but they contain different sets of non-SMC subunits.

Conclusion. Thus, in the present study, the association of the NCAPD3 gene with psychological tests was confirmed. Controversial results were obtained for the "TT" genotype. On average, carriers of "TT" genotype are more daring and, at the same time, more sluggish, apathetic and relaxed compared to carriers of other genotypes.

The reported study was funded by RFBR, project number 20-015-00397.

Disclosure: Nothing to disclose.

doi: [10.1016/j.euroneuro.2021.08.049](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.08.049)

TU47.

EXOME SEQUENCING STUDY FOR IDENTIFICATION OF DE NOVO MUTATIONS OF IDIOPATHIC INTELLECTUAL DISABILITY IN CHILDREN FROM THE 2004 PELOTAS (BRAZIL) BIRTH COHORT

Karen Sánchez-Luquez¹, Simone Menezes Karam², Alicia Matijasevich³, Iná da Silva dos Santos¹, Aluisio J D Barros¹, Luciana Tovo-Rodriguez¹

¹Universidade Federal de Pelotas; ²Universidade Federal do Rio Grande; ³School of Medicine, University of São Paulo

Background: Intellectual Disability (ID) affects 2-3% of population worldwide (1). Whole exome sequencing (WES) has been considered a successful strategy for ID genetic studies, providing a growing list of both candidate and validated ID genes (2). The majority of the studies in literature used clinical samples. Very few studies using population-based samples has been conducted, a design that can provide more realistic ID prevalence estimates. Additionally, few studies have been performed in middle-income countries. In southern Brazil, in the 2004 Pelotas Birth Cohort study, whose participants have been followed eight times since birth (3), ID prevalence was 4.5%. A total of 12.6% were classified as idiopathic (4). These individuals were chosen for evaluation by WES. In this study we aim to clarify ID etiology, performing WES in individuals with idiopathic ID from the 2004 Pelotas Birth Cohort study to identify de novo variants (DNVs).

Methods: WES was performed on 13 ID patients (8 boys) and their parents, in a trio design, when participants were 15 years of age. A score below 70 at WPPSI and WISC-III (5,6) intelligence scales at 4 and 7 years of age was considered inclusion criteria to select individuals to genetic

study, including clinical, cytogenetics and molecular diagnosis of the cohort members. Individuals who persist without diagnosis were selected for exome analysis. Genomic DNA was obtained from participants' blood and saliva samples. WES was performed using the Twist Human Core Exome kit (Twist bioscience) on an Illumina sequencer (Illumina, Inc.). Alignment/mutation detection (based on GRCh37) was done by custom bioinformatics processes (germ algorithm v3.5). Pathogenicity of the variants was classified according to American College of Medical Genetics (ACMG) protocol (7).

Results: Our analysis revealed no pathogenic or probably pathogenic variants that could explain the clinical findings observed in 13 participants. One proband (7,7% of the adolescents) presented a variant of uncertain significance (VUS) in heterozygosis. The variant NM_003688.3: c.2410G>A: p.(Gly804Ser) was identified in the exon 25 of the Calcium/calmodulin dependent Serine Protein Kinase (CASK) gene (Xp11.4). This mutation (dbSNP: rs1064796884) results in a non-conservative amino acid substitution. Clinical findings included microcephaly, intellectual disability, anxiety and depression as documented in this cohort member. Microcephaly and mild intellectual disability were reported in family history also. Preliminary karyotype and CGH-array were normal.

Discussion: This study is one of the few population-based cohort studies from low and middle income countries. Only one individual had a compatible response from classic clinical characteristics. The prevalence of positive genetic results observed is in agreement with those found in population-based studies(8). The CASK gene was already linked to FG Syndrome, 4 [FGS4, OMIM:300422] and Intellectual disability and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia [OMIM:300749]. It is possible that the remaining individuals have mutations in regulatory regions and we were not able to assess(9). Data obtained from these patients may be reanalyzed in the future, and they may be eligible for whole genome sequencing(10).

Disclosure: Nothing to disclose.

doi: [10.1016/j.euroneuro.2021.08.050](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.08.050)

TU48.

THE COMPLETE IQ PROFILE OVER THE LIFESPAN IN INDIVIDUALS WITH 22Q11DS AND ASSOCIATIONS WITH COMMON GENETIC VARIATION FOR IQ AND SCHIZOPHRENIA

Ania Fiksinski¹, Rielle Wierenga², The International Brain and Behavior Consortium on 22q11DS³, Jacob Vorstman⁴, Therese van Amelsvoort¹

¹MHeNS, Maastricht University; ⁴Hospital for Sick Children Toronto; ²Wilhelmina Children's Hospital and University Medical Center Utrecht, Brain Center; ³22q-IBBC

Background: The 22q11.2 deletion is the most common microdeletion and is associated with a ~25% risk for schizophrenia and a ~45% risk for intellectual disability. The 22q11.2 deletion syndrome (22q11DS) is thus incompletely penetrant for these phenotypes, and provides a