



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANÁLISE GENÉTICA EM
PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL INDETERMINADA,
DE UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-
GOIÁS**

VINICIUS MONTENEGRO TORRES

Goiânia

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

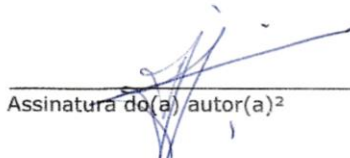
Nome completo do autor: Vinicius Montenegro Torres

Título do trabalho: Caracterização Clínica e Análise Genética em Pacientes com Deficiência Intelectual Indeterminada, de uma Instituição de Internação Crônica em Trindade-Goiás

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 17 / 02 / 2019.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

VINICIUS MONTENEGRO TORRES

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANÁLISE GENÉTICA EM
PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL INDETERMINADA,
DE UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-
GOIÁS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientador: Prof. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Co-orientador: Prof. Dra. Nádia Aparecida Bérghamo

GOIÂNIA-GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Montenegro Torres, Vinicius

Caracterização Clínica e Análise Genética em Pacientes com Deficiência Intelectual Indeterminada, de uma Instituição de Internação Crônica em Trindade-Goiás [manuscrito] / Vinicius Montenegro Torres. - 2019.

XVIII, 147 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo; co-orientadora Dra. Nádia Aparecid Bérgamo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Deficiência Intelectual indeterminada. 2. Paralisia Cerebral. 3. Cariótipo. 4. MLPA. 5. Análise cromossômica por microarranjos. I. Arilho Ribeiro Bicudo, Lucilene, orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 73

1
2 Aos vinte e nove dias do mês de janeiro do ano de dois mil e dezenove, às
3 catorze horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da
4 Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca
5 examinadora: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo, Profa. Dra. Vera
6 Aparecida Saddi, Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, Prof. Dr. Bruno
7 Faulin Gamba e Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva para, em sessão pública
8 presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa
9 de tese intitulada "**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANÁLISE GENÉTICA EM**
10 **PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL INDETERMINADA, DE**
11 **UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-GOIÁS**",
12 em nível de doutorado, área de concentração em Bioquímica e Genética, de
13 autoria de **Vinicius Montenegro Torres**, discente do Programa de Pós-
14 Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão
15 foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da
16 banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da tese que em cerca de
17 quarenta e cinco minutos procedeu à apresentação de seu trabalho.
18 Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado,
19 tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de
20 arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em vista o que consta na
21 Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e
22 Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências
23 Biológicas, a tese foi aprovada, considerando-se integralmente
24 cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Doutor em Ciências
25 Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á
26 quando da entrega da versão definitiva da tese na Secretaria do programa,



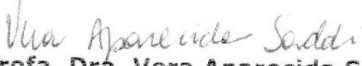
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de
28 trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às
29 18 horas e 15 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de tese e, para
30 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
31 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
32 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
33 teor.

34 
35 **Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo**

36 Presidente da Banca

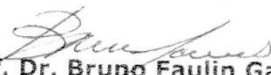
37 Universidade Federal de Goiás

38 
39 **Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi**

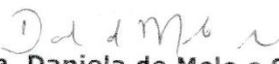
40 Universidade Federal de Goiás

41 
42 **Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo**

43 Universidade Federal de Goiás

44 
45 **Prof. Dr. Bruno Faulin Gamba**

46 Universidade Federal de Goiás

47 
48 **Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva**

49 Universidade Federal de Goiás

Dedicatória

Em primeiro lugar, dedico esta tese a Deus, por me dar força e saúde para realizar esta importante etapa da minha vida.

À minha esposa, que é a parceira nas horas difíceis, a companheira na luta diária, o amor da minha vida e o coração da minha família.

À Bianca e Giovana Torres, minhas filhas, que são fontes incondicionais de amor e de ternura para a minha alma.

À minha mãe Maria Eleusa, que me apoia, “mima” e estimula.

Ao ex-prefeito de Goiânia Paulo de Siqueira Garcia, *in memoriam*, pela sensibilidade e apoio, para que eu realizasse este trabalho.

Agradecimentos

Às professoras doutoras Juliana Forte Mazzeu e Vera Aparecida Saddi, que colaboraram com abnegação e excelência com este estudo; não tenho palavras para expressar minha gratidão a vocês.

À Vila São José Bento Cottolengo, seus funcionários e pacientes. A admiração e respeito pelos trabalhos realizados nesta instituição é gigantesca, como também, a minha dedicação a esta.

Ao meu amigo Sebastião José da Motta e sua esposa Elza Machado Motta, pela amizade e carinho por mim e minha família.

Ao meu irmão Roberto Torres Júnior, pela grande ajuda na parte estatística.

À minha tia Vânia Mar Montenegro, pelo grande apoio a este projeto.

Às minhas orientadoras, Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo e Dra. Nádia Aparecida Bérghamo, pela dedicação a este projeto.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	VI
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Quadros.....	XI
Lista de Anexos	XII
Resumo.....	XIII
Abstract	XV
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Classificação da DI	02
1.2. Etiologia.....	03
1.3. Deficiência Intelectual e Genética	04
1.3.1. Métodos de Diagnóstico Genético	04
1.3.2. Etiologia Genética da DI.....	06
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. Casuística e Metodologia da Avaliação Clínica	19
4.2. Coleta das Amostras Biológicas e Análises Genéticas	21
4.3. Citogenética Clássica (Cariótipo).....	24
4.4. Análise das Regiões Subteloméricas (MLPA).....	25
4.5. Análise Cromossômica por Microarranjos.....	27
4.6. Pesquisa da Síndrome do X Frágil (PCR).....	32
4.7. Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS	34

5.1. Avaliação Clínica	34
5.1.1. Características Sociodemográficas e Familiares.....	34
5.1.2. Classificação da DI.....	35
5.1.3. Avaliação Antropométrica.....	36
5.1.4. Comorbidades na DI Sindrômica.....	37
5.1.5. Associações entre a Gravidade da DI e as Demais Informações Pesquisadas.....	39
5.1.6. Caso Suspeito de Ataxia Espinocerebelar Tipo 7.....	43
5.2. Avaliação Genética	44
5.2.1. Cariótipo.....	44
5.2.2. Análise das Regiões Subteloméricas (MLPA).....	45
5.2.3. Pesquisa da Síndrome do X-Frágil (PCR).....	48
5.2.4. Análise Cromossômica por Microarranjos.....	48
5.2.4.1. Paciente 1.....	49
5.2.4.2. Paciente 2.....	51
5.2.4.3. Paciente 7.....	53
5.2.4.4. Paciente 11.....	55
5.2.4.5. Paciente 16.....	57
5.2.4.6. Paciente 17.....	59
5.2.4.7. Paciente 20.....	61
6. DISCUSSÃO	65
6.1. Discussão dos Achados Clínicos.....	65
6.1.1. Características Sociodemográficas e Familiares.....	65
6.1.2. Classificação da DI.....	66
6.1.3. Avaliação Antropométrica.....	67
6.1.4. Comorbidades na DI Sindrômica.....	67
6.1.5. Associações entre a Gravidade da DI e as Demais Informações Pesquisadas.....	68

6.1.6. Caso Suspeito de Ataxia Espinocerebelar Tipo 7.....	71
6.2. Discussão dos Resultados dos Exames Genéticos.....	71
6.2.1. Cariótipo.....	71
6.2.2. Análise das Regiões Subteloméricas (MLPA).....	71
6.2.3. Pesquisa da Síndrome do X-Frágil (PCR).....	72
6.2.4. Análise Cromossômica por Microarranjos.....	72
6.2.4.1. Paciente 1.....	72
6.2.4.2. Paciente 2.....	73
6.2.4.3. Paciente 7.....	75
6.2.4.4. Paciente 11.....	77
6.2.4.5. Paciente 16.....	81
6.2.4.6. Paciente 17.....	83
6.2.4.7. Paciente 20.....	86
6.2.4.8. Discussão dos Achados da Análise Cromossômica por Microarranjos.....	88
7. CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	94

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGD: Atraso Global no Desenvolvimento
AMPK: *AMP-activated Protein Kinase*
APA: *American Psychiatric Association*
BCL11A: *B-cell Cll/Lymphoma 11 Gene*
BDH1: *3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase 1 Gene*
BE: Baixa Estatura
BMT: *Bone Marrow Transplant*
BP: Baixo Peso
CIF: Classificação Internacional de Funcionalidade, Incapacidade e Saúde
CDC: *Center of Diseases Control*
CGH-array: *Comparative Genomic Hybridization-array*
CHD1L: *Chromodomain Helicase Dna-binding Protein 1-Like Gene*
COPI: *Constitutive Photomorphogenesis Protein 1*
CRLG: Coeficiente da Regressão Logística da Gravidade
DI: Deficiência Intelectual
DIS: Deficiência Intelectual Sindrômica
DINS: Deficiência Intelectual Não Sindrômica
DLG1: *Discs Large, Drosophila, Homolog of, 1 Gene*
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DPAGT1: *Dolichyl-Phosphate N-Acetylglucosamine Phosphotransferase*
DSM-5: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5*
EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
ERC1: Interacting/cast family, member 1 gene
FMR1: *Fragile X Mental Retardation 1 gene*
GADI: Genes Associados com a DI
GJA5: *Gap Junction Protein Alpha-5 Gene*
GJA8: *Gap Junction Protein Alpha-8 Gene*
HYDIN: *Hydrocephalus-inducing Gene*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB1: Instituto de Ciências Biológicas 1

IMC: Índice de Massa Corporal

ISCN: *International Sustainable Campus Network*

KANK1: *KN Motif and Ankyrin Repeat Domain-containing Protein 1 Gene*

MAPK: proteínas-cinases ativadas por mitógenos

MLPA: amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação

NBPF: *Neuroblastoma breakpoint family*

OEA: Organização dos Estados Americanos

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

PAK2: *Protein-activated Kinase 2 Gene*

PC: Perímetro Craniano

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

PRKAB2: *Protein Kinase Amp-activated Beta-2 Gene*

REL: *Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SDHPR: Secretaria de Direitos Humanos da Presidência da República

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SXF: Síndrome do X-Frágil

TEA: Transtorno do Espectro Autista

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDAH: Transtorno do Espectro Autista

TOR: *Target of Rapamycin*

TFRC: *Transferrin Receptor*

UCSC: *University of California Santa Cruz*

UFG: Universidade Federal de Goiás

USP34: *Ubiquitin-Specific Protease 34 Gene*

VNTR: *Variable Number Tandem Repeats*

VPS11: *Vacuolar Protein Sorting 11*

VSJBC: Vila São José Bento Cottolengo

WNT: *Wingless-Integration*

XPO1: *Exportin 1 Gene*

ZDHHC9: *Zinc Finger Dhhc Domain-Containing Protein 9 Gene*

Lista de Figuras

Figura 1 – Genes implicados com a Deficiência Intelectual ligada ao X e suas coordenadas no cromossomo X.....	14
Figura 2 - Fluxograma da seleção dos pacientes para o estudo.....	22
Figura 3 - Fluxograma para a realização dos exames genéticos dos pacientes com Deficiência Intelectual indeterminada.....	23
Figura 4 – Frequência do acometimento familiar na amostra.....	35
Figura 5 – Frequências relativas encontradas na avaliação e classificação dos parâmetros pômbero-estaturais dos pacientes da amostra.....	37
Figura 6 – Distribuição da frequência relativa do nível de gravidade da Deficiência Intelectual dos pacientes em função do sexo.....	39
Figura 7 - Heredograma da família com diagnóstico de ataxia espinocerebelar tipo 7. O indivíduo IV-2 é o probando. Mãe (III-1) e avó materna (II-1) apresentam um alelo mutado, bem como o indivíduo II-4. Outros indivíduos apresentam sintomas da doença e estão em investigação.....	44
Figura 8 – Laudo do cariótipo de um dos pacientes do estudo.....	45
Figura 9 - Representação da MLPA com resultado normal de um dos pacientes do estudo (Kit SALSA MLPA P036 e software Coffalyser).....	46
Figura 10 – Representação de uma MLPA hipotética detectando uma deleção na região 3p (Kit SALSA MLPA P036 e software Coffalyser).....	47
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação da região CGG do gene <i>FMR1</i> de 12 pacientes da amostra. M é o marcador da reação, a canaleta quatro é o caso do sexo masculino com resultado positivo 9sem amplificação) e as colunas 3, 9 e 10 são os indivíduos do sexo feminino com resultado inconclusivo (uma banda apenas).....	49
Figura 12 – Resultado da análise cromossômica por microarranjos da paciente com microduplicação na região 20p13.....	50

Figura 13 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos do paciente com deleção na região 2p15.....	52
Figura 14 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos do paciente com microduplicação da região 3q29.....	54
Figura 15 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos demonstrando um rearranjo cromossômico complexo de aproximadamente 438kb na região 12p13.33.....	56
Figura 16 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos demonstrando uma deleção de aproximadamente 1,55 Mb na região 2q12.2q12.3.....	58
Figura 17 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos demonstrando uma deleção na região 1q21.1q21.2.....	60
Figura 18 – Resultado da análise cromossômica por microarranjos da paciente com deleção na região 9p24.3 (<i>KANK1</i>).....	62
Figura 19 – Imagens da tomografia de crânio da paciente com a deleção em 9p24.3 exibindo hidranencefalia.....	64
Figura 20 - Alinhamento das deleções identificadas com array-CGH e descritas pela revisão sistemática de Thevenon e colaboradores (2013). A menor região de sobreposição em todos os pacientes (260 kb) contém apenas o gene <i>ELKS</i> / <i>ERC1</i>	80

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes com Deficiência Intelectual indeterminada por fases da vida.....	34
Tabela 2 - Distribuição da frequência absoluta e relativa do nível de gravidade da Deficiência Intelectual dos pacientes em função do sexo.....	36
Tabela 3 - Frequências absolutas e relativas de indivíduos com baixa estatura e índice de massa corpórea baixa, de acordo com os níveis de gravidade da Deficiência Intelectual.....	40
Tabela 4 - Distribuição das frequências dos pacientes com desordens do neurodesenvolvimento, deficiências múltiplas, malformações diversas e outras alterações, em função do nível de gravidade da Deficiência Intelectual.....	41
Tabela 5 - Descrição do rearranjo cromossômico complexo em 12p13.33 (tamanho, pontos de quebra distal e proximal).....	55

Lista de Quadros

Quadro 1- Variação no número de cópias recorrentes no genoma humano que causam ou predisõem a Deficiência Intelectual	8
Quadro 2 - Classes ontológicas de genes associados com a Deficiência Intelectual.....	13
Quadro 3 - Curvas de percentis e escore Z utilizadas na classificação dos dados antropométricos dos pacientes do estudo.....	20
Quadro 4 - Regiões subteloméricas pesquisadas pelo kit SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix – Versão E2 e os genes correlacionados com a DI localizados nestas regiões	28
Quadro 5 - Descrição das malformações do Sistema Nervoso Central encontradas nos pacientes do estudo.....	38
Quadro 6 - Manifestações clínicas da Síndrome da Microdeleção 2p15p16.1, como também, a presença ou ausência dos sinais e sintomas no paciente da amostra avaliada.....	74
Quadro 7 – Correlação entre as características dismórficas associadas à microdeleção 12p13.33 e as apresentadas pelo paciente deste estudo (Thevenon et al, 2013).....	78
Quadro 8 – Correlação entre as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes dos estudos prévios com microdeleção em 1q21.1 e as do caso avaliado.....	84

Lista de Anexos

Anexo 1 – Relatório com a aprovação da pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa da UFG	110
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	115
Anexo 3 - Ficha de Avaliação Clínica.....	118
Anexo 4 - Quadro com as informações dos pacientes do estudo sobre o sexo, a procedência, a idade, a gravidade da DI, a associação com TEA, os familiares acometidos e as avaliações antropométricas	121
Anexo 5 - Curvas de perímetro craniano propostas por Rollins e colaboradores (2010).....	123
Anexo 6 - Sumário das manifestações clínicas da casuística do estudo.....	124

Resumo

A DI é uma manifestação clínica que tem etiologia heterogênea e complexa, na qual 50% dos casos não possuem diagnóstico etiológico. Em 48 pacientes institucionalizados com Deficiência Intelectual (DI) e idade inferior a 25 anos, uma minuciosa avaliação clínica, laboratorial e radiológica foi realizada. Após esta investigação, 27 destes indivíduos foram classificados como portadores de DI indeterminada e submetidos aos exames de cariótipo, MLPA para a região subtelomérica, análise cromossômica por microarranjos e, quando justificado, PCR para pesquisa da Síndrome do X Frágil. Na avaliação clínica, a DI indeterminada destes indivíduos apresentou características sindrômicas, recorrência familiar, grave intensidade e associação com baixa estatura e peso. Nos casos de maior gravidade da DI indeterminada foi observada uma maior frequência de pacientes do sexo masculino, de comprometimento do IMC, de Epilepsia e de Deficiência Física. A Deficiência Auditiva, a Deficiência Visual e a baixa estatura apresentaram uma tendência em exibir o mesmo comportamento. A microcefalia e o Transtorno do Espectro Autista, contrariando os estudos anteriores, não apresentaram este comportamento. Os exames de cariótipo e MLPA para a região subtelomérica, apresentaram resultados normais em todos os casos avaliados. A avaliação clínica e exames moleculares de familiares evidenciaram um paciente com suspeita da Ataxia Espinocerebelar Tipo 7. A PCR para pesquisa da Síndrome do X Frágil detectou um indivíduo afetado. Em vinte e três casos foram realizadas análises cromossômicas por microarranjos e sete exibiram CNVs patogênicas (30,43%). Microdeleções, microduplicações e rearranjos complexos foram evidenciadas em diferentes cromossomos e com diferentes tamanhos. Alterações genéticas raras foram detectadas e colaboraram para definir o fenótipo associado a estes arranjos cromossômicos. Desta forma, estes dados indicam um forte componente genético nas DI indeterminadas. Os estudos anteriores e o atual corroboram para definir a análise cromossômica por microarranjos, o exame genético de escolha para a avaliação inicial da DI indeterminada. Esta técnica está se tornando mais acessível a cada dia e possui alta sensibilidade.

Palavras-chave: Deficiência Intelectual indeterminada, Paralisia Cerebral, cariótipo, MLPA e análise cromossômica por microarranjos.

Abstract

ID is a clinical manifestation that has heterogeneous and complex aetiology and 50% of it have no definite cause. In 48 patients institutionalized with Intellectual Disability (ID) and under 25 years of age, a detailed clinical, laboratory and radiological evaluation was performed. After this investigation, 27 individuals were classified as having undetermined ID and submitted to karyotype, MLPA of ID implicated subtelomeric regions, chromosomal microarray analysis and, when justified, PCR for screening of X Fragile Syndrome. In the clinical evaluation, these individuals with undetermined ID presented syndromic characteristics, family recurrence, severe intensity and association with short stature and weight. When greater severity of undetermined ID was observed, a greater frequency of male patients, low BMI, Epilepsy and Physical Deficiency was identified. Hearing Deficiency, Visual Impairment and short stature showed a tendency to exhibit the same behavior. Microcephaly and Autism Spectrum Disorder, contrary to previous studies, did not present this behavior. The karyotype and MLPA exams presented normal results in all cases. Clinical evaluation and molecular examination of relatives suggested that a patient had Spinocerebellar Ataxia Type 7. PCR screening for X Fragile Syndrome detected an affected individual. Twenty-three cases underwent chromosomal microarray analysis and seven pathogenic CNVs (30.43%) were detected. Microdeletions, microduplications and complex rearrangements were observed in different chromosomes and variable sizes. Rare genetic aberrations were detected and corroborated to define the phenotype associated with the subjects. Thus, obtained data indicated a strong genetic component in indeterminate ID. The current and previous studies corroborate to define chromosomal microarray analysis, the gold standard genetic test for initial evaluation in patients with undetermined ID. This technique is becoming more accessible and presents high sensitivity.

Keywords: Undetermined Intellectual Disability, Cerebral Palsy, Karyotype, MLPA and chromosome microarray analysis.

1. INTRODUÇÃO

A Deficiência Intelectual (DI), antes chamada de retardo mental ou de deficiência mental, é um grave problema de saúde pública, assim como, o Atraso Global no Desenvolvimento (AGD), termo utilizado para crianças menores de cinco anos, que não são capazes de cumprir os requisitos esperados para sua idade nas áreas do desenvolvimento social, motor e intelectual (principalmente NA linguagem). As limitações sociais, laborais e de auto-gestão nas pessoas com DI ou AGD, as tornam permanentemente dependentes de suas famílias e exigem de seus familiares um grande esforço físico, financeiro e psicológico, como também, dos serviços educacionais e dos sistemas de saúde (KATZ, LAZCANO-PONCE, 2008; MAULIK et al, 2011; APA, 2013).

Maulik e colaboradores (2011) realizaram uma meta-análise com 52 estudos publicados entre 1980 e 2009 e observaram uma prevalência mundial da Deficiência Intelectual de 10,37 por mil habitantes. A DI afeta 1,37% da população brasileira (aproximadamente 2.611.536 pessoas) e 1,26% da população goiana (aproximadamente 75.853 pessoas). Os dados do último censo demográfico indicam que o Brasil possui 45.606.048 de pessoas (23,91% da população) que apresentam pelo menos uma das deficiências pesquisadas (visual, auditiva, física ou intelectual) (BRASIL.IBGE, 2010; BRASIL.SDHPR, 2010).’

O Decreto nº 6949/2009 (RASIL, 2009) da Presidência da República do Brasil define que pessoas com deficiência “são aquelas que têm impedimentos de longo prazo de natureza física, mental, intelectual ou sensorial, os quais, em interação com diversas barreiras, podem obstruir sua participação plena e efetiva na sociedade em igualdades de condições com as demais pessoas.” Este decreto resultou da promulgação do texto da Convenção Internacional sobre os Direitos das Pessoas com Deficiência e seu Protocolo Facultativo, ocorrida em 30 de março de 2007, em Nova York-EUA (ONU, 2007).

A Deficiência Intelectual abrange as incapacidades nas habilidades mentais gerais, que afetam o funcionamento adaptativo em três domínios ou áreas. Estes domínios determinam o quão bem um indivíduo lida com as tarefas diárias. O domínio conceitual inclui as habilidades em linguagem, leitura, escrita,

matemática, raciocínio, conhecimento e memória. O domínio social refere-se à empatia, julgamento social, habilidades de comunicação interpessoal, à habilidade de fazer e manter amizades e as capacidades semelhantes. O domínio prático se refere à auto-gestão em áreas como cuidados pessoais, responsabilidades do trabalho, gestão de dinheiro, recreação e organização de tarefas escolares e do trabalho (APA, 2013).

Enquanto que o diagnóstico de Deficiência Intelectual não tem um requisito específico em relação à idade, o início dos sintomas deve ocorrer durante o período de desenvolvimento. Os pacientes são diagnosticados com base na gravidade dos déficits na capacidade adaptativa. A DI é considerada uma manifestação crônica e, frequentemente, ocorre de forma simultânea com outras condições mentais, como Depressão, Déficit de Atenção/Hiperatividade e Transtorno do Espectro Autista (APA, 2013).

A Portaria Nº 199/2014 do Ministério da Saúde, de 30 de janeiro de 2014, instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. Esta definiu as diretrizes para o atendimento das pessoas com doenças raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da qualificação dos profissionais da rede básica para o atendimento e encaminhamento destes pacientes, criação de centros especializados nestas enfermidades e destinação de verbas específicas para a execução desta política (BRASIL, 2014).

O eixo I das moléstias atendidas por esta portaria é composto pelas doenças raras de origem genética e está dividida em três grupos: as anomalias congênitas ou de manifestação tardia, a Deficiência Intelectual e os erros inatos de metabolismo. Nesta portaria, a inclusão do atendimento às pessoas com DI de etiologia genética reforça a sua importância no contexto da saúde pública brasileira. O eixo II é composto por doenças raras de origem não genética e organizado nos seguintes grupos: infecciosas; inflamatórias e autoimunes (BRASIL, 2014).

1.1. Classificação da DI

O DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5*) classifica a gravidade da DI em leve, moderada, grave e profunda. Nesta última revisão do manual, os termos Deficiência Intelectual ou Transtorno do

Desenvolvimento Intelectual substituíram o termo Retardo Mental, como também, foi incluído o conceito de “Atraso Global no Desenvolvimento”, para designar déficits intelectuais em crianças menores de cinco anos (APA, 2013).

A classificação de gravidade da DI é uma tarefa desafiadora e necessita de um contato íntimo entre os profissionais de saúde e as pessoas com deficiência. As ferramentas utilizadas para esta gradação são a Classificação Internacional de Funcionalidade, Incapacidade e Saúde de 2001 (CIF), os testes de quociente intelectual (QI) e as avaliações clínicas (WHO, 1989, 2001; MAULIK et al, 2011).

A gravidade da DI pode ser classificada com base no quociente de inteligência (QI). Valores abaixo de 70 identificam indivíduos com DI, os quais podem ser distinguidos como DI leve (QI 50-70), DI moderada (QI 30-49), DI grave (QI 20-39) e DI profunda (QI < 20). A gravidade da DI é leve em 84% dos casos, moderada em 10% dos casos, grave em 4% dos casos e profunda em 2% destes (WHO, 1989, 2001; MAULIK et al, 2011; MEFFORD, BATSHAW, HOFFMAN, 2012; APA, 2013).

1.2. Etiologia

A DI é uma manifestação clínica que tem etiologia heterogênea e complexa, na qual 50% dos casos não possuem diagnóstico etiológico. Os aspectos sociais e políticos influenciam diretamente no seu aparecimento, o que pode ser comprovado, pela constatação de que a prevalência da DI é maior nos países com baixa e média renda *per capita*, quando comparados aos países com alta renda *per capita*. Independentemente de desenvolvimento econômico, a DI tem alta prevalência em todos os países do mundo e traz consequências negativas para as relações sociais de seus habitantes, como também, para suas economias (MAULIK et al, 2011; LÓPEZ-PISON et al, 2014).

Os fatores etiológicos que levam ao aparecimento da DI podem ocorrer no período pré-natal, perinatal e pós-natal. No período pré-natal são importantes causas de DI, as doenças genéticas, as substâncias teratogênicas (álcool, tabaco, drogas) e as infecções congênitas (sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus e rubéola). No período perinatal estão implicadas na sua etiologia as

complicações do parto, a prematuridade, os acidentes vasculares encefálicos e os distúrbios metabólicos (hipoglicemia e hiperbilirrubinemia) (KATZ, LAZCANO-PONCE, 2008; TORRES, SADDI, 2015).

No período pós-natal a DI pode ter como etiologia, entre outras, as infecções graves, as meningoencefalites e as causas externas (maus tratos, quase afogamentos e acidentes automobilísticos) (KATZ, LAZCANO-PONCE, 2008; KAUFMAN, AYUB, VINCENT, 2010; TORRES, SADDI, 2015).

1.3. Deficiência Intelectual e Genética

1.3.1. Métodos de Diagnóstico Genético

A principal técnica da citogenética convencional, o cariótipo vem sendo utilizado nos últimos 50 anos para diagnosticar afecções genéticas, entre estas, a Deficiência Intelectual. O cariótipo tem a vantagem de analisar de uma só vez todo o genoma e permite realizar uma triagem inicial das anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais. A desvantagem deste método é a sua baixa resolução, que é limitada a alterações maiores que 5-10Mb (VIANA, 2016).

A técnica de cariótipo de alta resolução possui uma taxa de diagnóstico um pouco maior do que a convencional e detecta alterações com tamanho aproximado de 3-4Mb. A elucidação das alterações menores que 3Mb somente é possível com a utilização de técnicas moleculares (RAUCH et al, 2006; BALIKOVA et al, 2007; SHINAWI, CHEUNG, 2008; RODRIGUES, 2010).

A área da genética foi beneficiada pelo avanço tecnológico ocorrido nos últimos 20 anos, quando foram desenvolvidas as novas técnicas moleculares de investigação do DNA. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a análise cromossômica por microarranjos, a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) e o sequenciamento genômico de nova geração estão entre estes métodos. Desde então, alterações estruturais submicroscópicas se tornaram detectáveis e foram chamadas de variações no número de cópias (CNVs), como também, puderam ser identificadas as

mutações genéticas pontuais e os polimorfismos de base única (SNPs) (BARONCINI et al, 2005; WILFERT et al, 2017; VIANA, 2016).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é um método molecular utilizado para a identificação de rearranjos cromossômicos específicos, por meio da hibridização de uma sequência de DNA clonada (sonda ou probe) e marcada por fluorescência. A técnica tem a vantagem de ser relativamente rápida de ser executada, porém, tem a desvantagem de não permitir a varredura genômica e requerer conhecimento prévio da região cromossômica a ser analisada. Este exame pode ser utilizado para identificar CNVs, alterações cromossômicas numéricas e estruturais, porém, não permite dimensionar a quantidade de material genético deletado ou duplicado, o que dificulta uma correlação genótipo-fenótipo acurada (KALLIONIEMI et al, 1996; RAVNAN et al, 2005; RAUCH et al 2006).

A técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) é um método sensível, prático, econômico e rápido. Em um único experimento, quantifica o número de cópias de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos. O método permite detectar deleções e duplicações em diversos genes, além de mutações pontuais já conhecidas. Entretanto, não é capaz de identificar rearranjos cromossômicos balanceados ou alterações externas às regiões de anelamento das sondas. Os painéis do MLPA avaliam regiões cromossômicas específicas, desta forma, para que tenha efetividade no diagnóstico necessita que, estudos anteriores, já tenham definido a localização da mutação desencadeadora dos sintomas clínicos (SORENSEN et al, 2008; SILVA-COSTA et al, 2009; JEHEE et al, 2011; LACZMANSKA et al, 2011).

O método de análise cromossômica por microarranjos (CMA) proporciona um aumento substancial na resolubilidade das análises cromossômicas e detecta pequenos ganhos ou perdas de segmentos de DNA. Na população, a variação do número de cópias de DNA (CNVs) é uma fonte de variabilidade genômica, porém, também está envolvida na fisiopatologia de diversas manifestações clínicas. Estes rearranjos submicroscópicos desequilibrados não são detectados pelos métodos de citogenética clássica e, com o uso desta técnica, foram visualizados em casos de DI indeterminada (15%), Epilepsia e Transtorno do Espectro Autista (XU, CHEN, 2003; CONRAD et al, 2006;

HENRICHSEN, CHAIGNAT, REYMOND, 2009; HOCHSTENBACH et al, 2011; TUCKER et al, 2011; HEHIR-KWA et al, 2013, CARTER et al, 2017).

1.3.2. Etiologia Genética da DI

A etiologia genética é a causa mais frequente de DI, Rearranjos cromossômicos ou mutações são identificadas em, aproximadamente, um terço dos pacientes (DES PORTES, LIVET, VALLÉE, 2002; ROPERS, 2010; COOPER et al, 2011; MEFFORD, BATSHAW, HOFFMAN, 2012). A implementação das novas técnicas de biologia molecular abriu as portas para a detecção destas alterações, principalmente, nos portadores de formas graves de DI. Nos últimos anos, a prevalência da DI de etiologia genética aumentou significativamente, o que fez diminuir a quantidade de indivíduos com diagnóstico de DI indeterminada.

A forma leve da DI representa a linha inferior da inteligência normal e é resultado da interação de fatores ambientais e genéticos. O seu diagnóstico clínico é extremamente complexo, pois os profissionais de saúde, frequentemente, ficam indecisos se o indivíduo apresenta uma DI leve ou um QI normal. Esta alta complexidade faz com que pouco se saiba a respeito dos fatores genéticos envolvidos no seu aparecimento. Algumas microduplicações ou microdeleções foram correlacionadas com a DI leve, porém, não podem ser consideradas isoladamente como causas de DI leve (Quadro 1) (ROPERS, 2010).

O quadro clínico da DI de etiologia genética, segue as classificações para as DI de outras causas. Entretanto, quando é acompanhada de sintomas característicos e recorrentes, é classificada como DI sindrômica. Quando isolada ou em conjunto com sintomas inespecíficos e discretos, é designada de DI não sindrômica. Esta classificação, apesar de útil, possui baixa correlação genótipo-fenótipo. Em estudos com séries de casos, CNVs nos mesmos genes e com características semelhantes geraram DI tanto sindrômica quanto não sindrômica (KAUFMAN, AYUB, VINCENT, 2010).

Em relação ao tipo de mutação, estas são descritas desde anomalias cromossômicas até mutações gênicas pontuais. As alterações cromossômicas

numéricas (Síndrome de Down, de Patau e de Edwards) e estruturais são diagnosticadas pelo cariótipo. Isoladamente, a Síndrome de Down é responsável por 8,8% dos casos de DI de etiologia genética, enquanto que as outras alterações cromossômicas microscópicas são responsáveis por 3,2% destes casos (Síndrome de Cri-du-chat, de Wolf-Hirschhorn, de Angelman e de Prader-Willi, entre outras) (LEONARD, WEN, 2002; VAN KARNEBEEK et al, 2005a, 2005b; HOCHSTENBACH et al, 2011; ARTIGAS-PALLARÉS, GUITART, GABAU-VILA, 2013).

Aberrações cromossômicas menores e mutações gênicas relacionadas com a DI são diagnosticadas pelas técnicas moleculares descritas, entre elas, podemos ressaltar as microduplicações, microdeleções, microinversões, as variações genômicas de polimorfismo de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNP), repetições em tandem de número variável (*Variable Number Tandem Repeats* – VNTR) e presença ou ausência de elementos de transição (*Alu*) (XU, CHEN, 2003; BECKMANN, ESTIVILL, ANTONARAKIS, 2007; HOCHSTENBACH et al, 2011; TUCKER et al, 2011; VISSERS, STANKIEWICZ, 2012).

As formas autossômicas são responsáveis por mais de 90% das DI de etiologia genética. Na maior parte dos casos, a forma autossômica dominante ocorre por mutações de novo, visto que, pacientes com DI raramente se reproduzem. A forma autossômica recessiva ocorre, principalmente, em famílias com alta consanguinidade e que apresentam DI leve (ROPERS, 2010).

Em uma revisão sistemática, Ropers (2010) identificou em torno de 20 regiões cromossômicas autossômicas, que apresentaram CNVs recorrentes em indivíduos com DI. Nestes resultados, a maioria das regiões estava correlacionada com a DI, tanto na presença de deleções, quanto de duplicações. Este fato sugere que, a expressão diminuída ou aumentada de um mesmo gene pode desencadear a DI (Quadro 1).

Quadro 1- Variação no número de cópias recorrentes no genoma humano que causam ou predisõem a Deficiência Intelectual.

Região genômica	DI e alterações associadas	Dismorfismos
1q21 microdeleção	DI leve e moderada, TEA e esquizofrenia	Microcefalia, catarata, e anormalidades cardíacas
1q21 microduplicação	DI e TEA	Macrocefalia e anormalidades congênitas
2p15p16 microdeleção	DI moderada e grave	Microcefalia, hipoplasia de nervo ótico, hidronefrose, anormalidades na face e camptodactilia
3q29 microdeleção	DI leve e moderada e TEA	Microcefalia, dismorfismos faciais, ataxia, deformidade na parede torácica e dedos longos
3q29 microduplicação	DI leve e moderada	Microcefalia e malformações oftalmológicas
5q35 microdeleção (Síndrome de Soto)	DI severa e dificuldade escolar	Gigantismo, macroencefalia e dismorfismos faciais
7q11.23 microdeleção (Sínd. De Williams-Beuren)	DI e déficit de atenção	Estenose aórtica, dentes pequenos, anormalidade faciais e hérnias
7q11.23 microduplicação/ Triplicação	DI leve, TEA, atraso na fala e Epilepsia	Trigonocefalia tipo II, displasia cortical e atraso no crescimento
8p23.1 microdeleção	DI e hiperatividade	Hérnia diafragmática congênita, defeitos cardíacos e criptorquidia
9q22.3 microdeleção	DI, AGD e hiperatividade	Macrocefalia, trigonocefalia, anormalidades faciais e gigantismo

continua

Quadro 1- Variação no número de cópias recorrentes no genoma humano que causam ou predisõem a Deficiência Intelectual.

continuação

Região genômica	DI e alterações associadas	Dismorfismos
15q13.1 microduplicação	DI, TEA e esquizofrenia	...
15q13.3 microdeleção	DI leve, TEA, esquizofrenia e Epilepsia	Anormalidades na face e clinodactilia
15q24 microdeleção	DI leve	Atraso no crescimento, microcefalia, anormalidades nos dedos, hipospadia, tecido conjuntivo frouxo e anormalidades faciais
15q24 microduplicação	AGD	Dismorfismos faciais, anormalidades nos dedos e nos genitais
16p11.2 microdeleção	DI, TEA, atraso na fala e Epilepsia	Macrocefalia e anormalidades congênicas
16p11.2 microduplicação	Atraso na fala, atraso motor, TDAH e transtornos psiquiátricos	Microcefalia e anormalidades congênicas
16p11.2p12 microduplicação	DI	Dismorfismos faciais mínimos
16p13.1 microdeleção	DI, Epilepsia e esquizofrenia	Dismorfismos faciais
16p13.1 microduplicação	DI leve, TEA e esquizofrenia	...
17p11.2 microdeleção Síndrome de Smith-Magenis	DI, hiperatividade, automutilação e distúrbio do sono	Voz rouca, braquidactilia e hipotonia
17p11.2 microduplicação Síndrome de Potocki-Lupski	DI leve, TDAH e TEA	Hipotonia infantil, dificuldade de desenvolvimento, apneia do sono e anormalidades cardiovasculares

continua

Quadro 1- Variação no número de cópias recorrentes no genoma humano que causam ou predisõem a Deficiência Intelectual.

continuação

Região genômica	DI e alterações associadas	Dismorfismos
17p13.3 microdeleção (LIS1 gene)	DI e Epilepsia	Lisencefalia
17q11.2 microdeleção (NF1 gene)	DI	Manchas na pele, hipertelorismo, fâcies sindrômica
17q12 microdeleção	DI	Aumento de enzimas hepáticas, e DM tipo 2 precoce
17q12 microduplicação	DI leve e moderada; Epilepsia	...
17q21.31 microdeleção	DI e dificuldade de aprendizagem	Hipotonia neonatal, defeitos cardíacos, fâcies grosseira com a idade e dispraxia oromotora
17q21.31 microduplicação	DI severa, AGD e pobre interação social	Microcefalia, dedos anormais, hirsutismo e dismorfismos faciais
22q11 microdeleção	Dificuldade de aprendizagem leve, atraso na fala e esquizofrenia	Defeitos cardíacos, anormalidades renais, insuficiência velofaríngea, hipocalcemia neonatal, anormalidades faciais
22q11 microduplicação/ triplicação	DI e dificuldade de aprendizagem	...
22q11.21-q11.23 Microdeleção	DI	Anormalidades faciais, atraso no crescimento, malformação cardíaca e esqueléticas discretas
22q11.21-q11.23 Microduplicação	DI, atraso ou ausência da fala, não andar, apraxia e disartria	Anormalidades faciais
22q13 microdeleção	AGD, atraso/ausência da fala e TEA	Dismorfismos faciais mínimos

Abreviações: DI, Deficiência Intelectual; AGD, Atraso Global no Desenvolvimento; TEA, Transtorno do Espectro Autista; TDAH, Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade. Fonte: Modificado de Ropers, 2010.

Este autor estimou que, o número de genes autossômicos relacionados com a DI seria em torno de 850 a 900, porém, afirmou que não se surpreenderia, se este valor superasse a barreira do milhar. Utilizando-se de dados primários e secundários, Kochinke e colaboradores (2016) desenvolveram um catálogo de genes associados com a DI (GADI) e seus respectivos sintomas. Na atualização de janeiro de 2014, este banco de dados já continha 400 genes autossômicos recessivos, 139 genes autossômicos dominantes e 103 genes ligados ao X. Na atualização de dezembro de 2015, o número de genes saltou para 777, porém, o autor não detalhou os dados encontrados, como havia feito anteriormente.

Kochinke e colaboradores (2016) definiram a ontologia em aproximadamente 560 de 650 genes catalogados (função, co-expressão, entre outros) e subdividiram estes GADIs em 32 processos celulares diferentes, entre eles: via de sinalização Hedgehog, sinalização do glutamato, peroxissomos, glicosilação, cílios, metabolismo, desenvolvimento do sistema nervoso, metabolismo do RNA, entre outros. Os resultados obtidos pelo estudo estão demonstrados no Quadro 2.

As proteínas associadas aos GADIs apresentaram alta conectividade molecular e co-expressão. Cerca de 47% destas proteínas interagem entre si e formam uma rede entre suas classes ontológicas. Estas proteínas são co-expressas na forma de subunidades complementares ou unidades isoladas. A maior taxa de co-expressão destas proteínas ocorreu no cérebro e, dentre as estruturas cerebrais, no hipocampo. Esta região controla as funções cognitivas, como por exemplo o aprendizado e a memória. Estes dados sugerem que a DI é uma manifestação clínica influenciada por várias vias metabólicas, porém, interligadas entre si e com uma considerável convergência funcional (KOCHINKE et al, 2016).

Quando comparadas entre si, algumas classes ontológicas e seus respectivos GADIs desenvolveram quadros clínicos específicos e maior ocorrência de malformações em determinados sistemas. Por exemplo: mutações em genes relacionados ao reparo celular apresentam maior prevalência de anomalias ectodérmicas, baixa estatura e microcefalia; as ciliopatias apresentam com maior frequência obesidade e malformações urogenitais, renais, esqueléticas, oculares e cerebrais (KOCHINKE et al, 2016).

Quadro 2 - Classes ontológicas de genes associados com a Deficiência Intelectual.

	Classes ontológica	Nº de genes	Exemplos de genes
1	Metabolismo	250	<i>ABHD5, BSCL2, GATM, ...</i>
2	Transportadores	200	<i>GFAP, LAMP2, MPDU1, ...</i>
3	Desenvolvimento do sistema nerv.	191	<i>ASL, COL4A1, COL4A2, ...</i>
4	Metabolismo do RNA	162	<i>DARS, ZNF711, ZNF81, ...</i>
5	Transcrição	139	<i>ARID1A, ARID1B, BCKDHB, ...</i>
6	Mitocôndria	121	<i>MT-ATP6, MT-CO1, MT-CO2, ...</i>
7	Ciclo celular	86	<i>BLM, BUB1B, ERCC1, ...</i>
8	Sinapse	80	<i>FMR1, GAD1, GNPAT, ...</i>
9	Cromatina	68	<i>GLI2, GLI3, GON4L, ...</i>
10	Microtúbulos	68	<i>ARFGEF2, ASPM, ZFYVE26, ...</i>
11	Transporte de vesículas	61	<i>MYO5A, NLGN3, NLRP3, ...</i>
12	Sinalização MAPK	57	<i>IKBKG, KRAS, MEF2C, ...</i>
13	Sinalização de GTPase pequena	51	<i>OCRL, OPHN1, PAK3, ...</i>
14	Transporte de proteínas	51	<i>PARP1, PEX, PEX12, ...</i>
15	Transporte de íons	50	<i>ANK3, PHF6, ANO10, ...</i>
16	Resposta a fatores de crescimento	47	<i>ARHGEF6, ASCL1, CASK, ...</i>
17	Glicosilação	40	<i>B3GALNT2, B3GALTL, COG6, ...</i>
18	Reparo do DNA	35	<i>CUL4B, FANCD2, GTF2H5, ...</i>
19	Cílios	34	<i>IFT172, INPP5E, MKKS, ...</i>
20	Centrossomo	34	<i>MPLKIP, NDE1, OFD1, ...</i>
21	Actina	31	<i>CAPN10, CTDPI, EP300, ...</i>
22	Sinalização Wnt	24	<i>FGFR2, FGFR3, GLI3, ...</i>
23	Sinalização Hedgehog	24	<i>KIF7, NDST1, PAX6, ...</i>
24	Peroxisomos	21	<i>PECR, PEX1, PEX11B, ...</i>
25	Ubiquitinação	20	<i>PRKCG, RAB40AL, TBC1D7, ...</i>
26	Sinal. de receptor de glutamato	16	<i>GRIA3, GRIK2, GRIN1, ...</i>
27	Segregação cromossômica	10	<i>CDK5RAP2, CTCF, ERCC2, ...</i>
28	Contração de músculo cardíaco	7	<i>HDAC4, PDE4D, PIK3CA, ...</i>
29	Sinalização BMP	6	<i>SKI, SMAD4, WNT1, ...</i>
30	Sinalização TOR	5	<i>RELN, TBC1D7, TSC1, ...</i>
31	Transporte de microtúbulos	5	<i>LRPPRC, PAFAH1B1, MAP2K1, ...</i>
32	Sinal. de receptor de dopamina	3	<i>FLNA, GNAO1, GNAS, ...</i>

Abreviaturas: RNA, ácido ribonucleico; MAPK, proteínas-quinasas ativadas por mitógenos; DNA, ácido desoxiribonucleico; Wnt, do inglês *Wingless-Integration*; BMT, do inglês *Bone Marrow Transplant*;

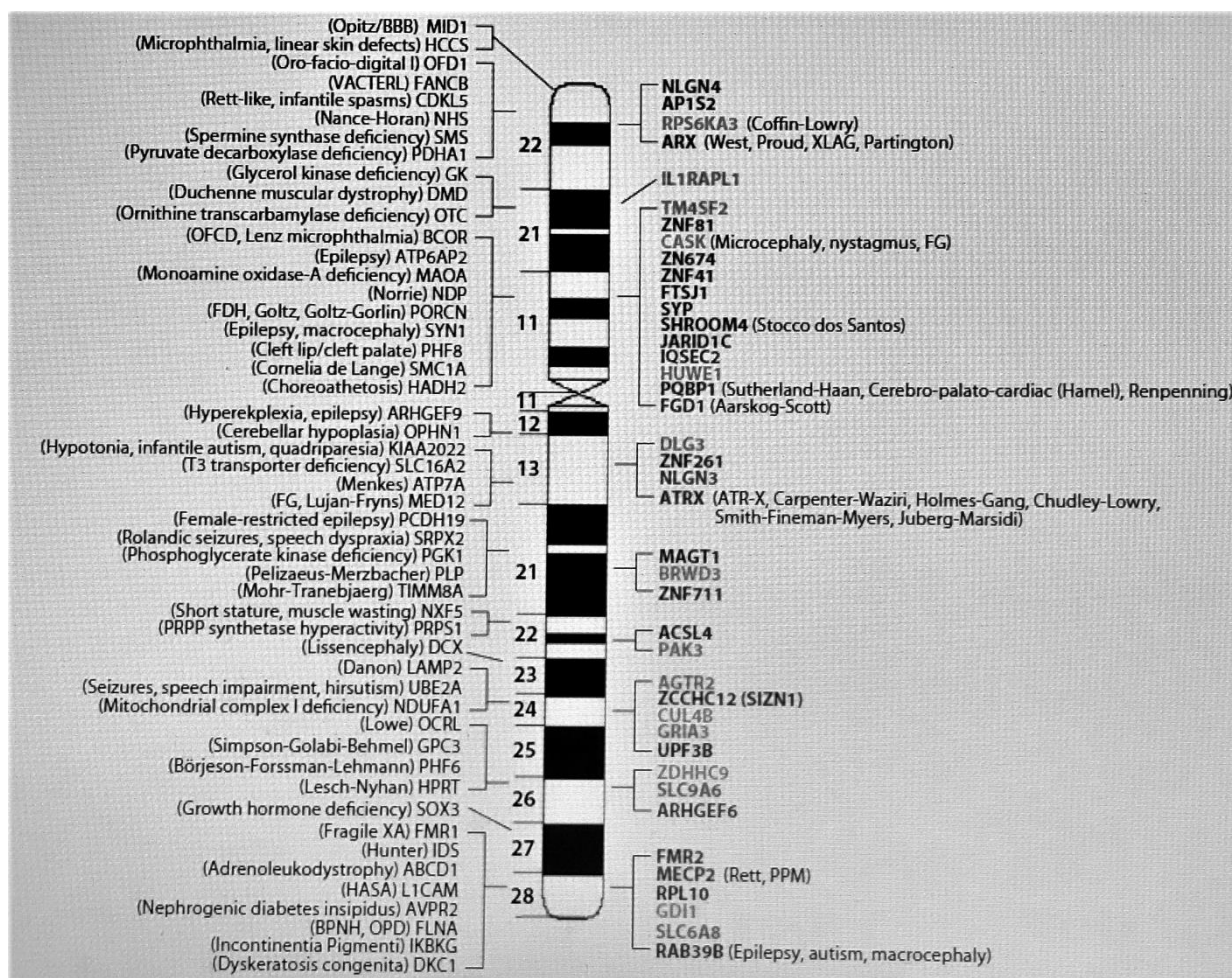
TOR, do inglês *Target of Rapamycin*. Fonte: Modificado de Kochinke e colaboradores (2016).

As regiões subteloméricas dos cromossomos possuem alta concentração de genes, nas quais se localizam numerosos GADIs e que são responsáveis por cerca de 2,5% dos casos de DI. As deleções terminais, na sua maioria, são originadas *de novo* e causam mais da metade destes casos de DI. A quase totalidade do restante das DI subteloméricas se originam por translocações não balanceadas entre dois cromossomos ou dois braços do mesmo cromossomo, e possuem caráter familiar (RAVNAN et al, 2005; WILFERT et al, 2017).

Nas regiões subteloméricas, microdeleções terminais implicadas com a Deficiência Intelectual foram observadas em 1p, 2q, 4p, 8p, 9q, 20p e 22q. As translocações não balanceadas mais comuns correlacionadas com o DI foram: a deleção ou duplicação de 10q; a deleção de 4p; a deleção de Yq; a duplicação de Xp/Yp e a duplicação de Xq. Nos últimos anos, a triagem das regiões subteloméricas vem ganhando importância nos protocolos de investigação da DI e das outras desordens do neurodesenvolvimento (RAVNAN et al, 2005).

As mutações e rearranjos nos genes do cromossomo X são responsáveis por aproximadamente 10% das DI no sexo masculino e desencadeiam quadros clínicos de diferentes gravidades. As últimas revisões sistemáticas detectaram mais de uma centena de GADIs localizados no cromossomo X e, surpreendentemente, este número pode estar subestimado, visto que, o cromossomo X possui em torno de 2000 genes e apenas 25% das famílias com Deficiência Intelectual e padrão de segregação ligada ao X tiveram seus genes responsáveis elucidados (Figura 1) (STEVENSON, SCHWARTZ, 2002; RAVNAN et al, 2005; ROPERS, 2010).

Os GADIs localizados no cromossomo X e suas respectivas proteínas participam de diferentes processos celulares, tais como transporte de íons, adesão celular, regulação de citoesqueleto de actina, ubiquitinação, transdução de sinal, regulação da transcrição, entre outros. A identificação de alguns destes genes, as suas localizações no cromossomo X e o quadro clínico relacionado estão descritos na Figura 1.



Fonte: Modificado de Ropers (2010)

Figura 1 – Genes implicados com a Deficiência Intelectual ligada ao X e suas coordenadas no cromossomo X.

A Síndrome do X Frágil (SXF) é a segunda maior causa genética de DI e é desencadeada por mutações em *FMR1*, que se localiza na região subtelomérica do cromossomo X. Do ponto de vista molecular, o que ocorre são expansões da repetição de trinucleotídeos CGG na porção 5 do gene. Acima de 200 repetições, o gene deixa de ser funcional, o que caracteriza a sua mutação completa. No quadro clínico da SXF, além da DI, foram observados distúrbios faciais (face grosseira e longa, fronte larga e mandíbula proeminente), prolapso de válvula mitral, peito escavado, macroorquidismo, alterações esqueléticas

(escoliose, articulações frouxas e pés planos), Epilepsia, hiperatividade e TEA. Alguns pacientes, em especial os do sexo feminino, podem apresentar poucas manifestações clínicas associadas à DI (não sindrômica), fato que dificulta o diagnóstico clínico.(OMIM, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico etiológico da DI, após a exclusão das causas mais comuns, é um dos grandes desafios da medicina. A entidade intitulada de DI de etiologia indeterminada ainda é um grande mistério para os profissionais de saúde e, provavelmente, tem um grande componente genético na sua etiologia. Nos últimos anos, a investigação clínica, laboratorial e genética dos pacientes com DI serviu para demonstrar que, a complexidade de diagnóstico é imensamente maior do que se esperava. Apesar disso, esta caracterização clínico-genética precisa continuar a ser realizada e nós brasileiros temos que contribuir com a nossa parcela para a elucidação deste quebra-cabeça (KOCHINKE et al, 2016).

Crianças e adolescentes com DI sofrem, frequentemente, de maus tratos por parte de seus familiares e da sociedade como um todo. As instituições filantrópicas de internação crônica abrigam estes pacientes, após serem abandonados pela família ou retirados do seio familiar por meios judiciais. Nestas instituições encontram-se as pessoas com DI mais vulneráveis, ou seja, aquelas com as manifestações mais graves. Pesquisas com estes indivíduos, além de sua importância científica, representam um importante trabalho social e humanístico (OEA,1999; BRASIL, 1999, 2001).

Por diversas razões, pacientes e suas famílias podem se beneficiar com o estabelecimento de um diagnóstico etiológico da DI indeterminada. Primeiro, o diagnóstico específico permite um melhor entendimento da doença e do seu prognóstico. O que pode influenciar na decisão sobre tratar ou não os sintomas associados (convulsões, distúrbios do comportamento, entre outros). Em segundo lugar, o diagnóstico permite recomendações antecipatórias específicas, como por exemplo encaminhar os pacientes e familiares a grupos de suporte apropriados, pesquisas e serviços educacionais. Terceiro, o aconselhamento genético só pode ser oferecido aos membros da família depois de um diagnóstico etiológico preciso (VAN KARNEBEECK et al, 2005a, 2005b).

Este estudo consistiu da caracterização clínico-genética de um grupo de indivíduos com DI indeterminada. Em Goiás, o uso combinado da avaliação clínica, do cariótipo, do MLPA e da análise cromossômica por microarranjos é

pouco frequente. A utilização sistemática dos antigos métodos de citogenética clássica e dos novos métodos de genética molecular fomenta o desenvolvimento das redes de diagnóstico regionais e amplia o conhecimento dos profissionais de saúde e pacientes sobre a genética clínica e a Deficiência Intelectual.

A elucidação do painel das mutações e rearranjos cromossômicos que desencadeiam a DI abrirá as portas para medidas que possam reduzir a sua prevalência e melhorar a vida destas pessoas. Apesar destas medidas ainda serem um sonho distante, se não investirmos na pesquisa genético-clínica, nada mudará e manteremos estas pessoas em situação de vulnerabilidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar, por meio de exames clínicos e genéticos, as principais características dos indivíduos da Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás, com idade menor que 25 anos e que apresentam Deficiência Intelectual ou Atraso Global no Desenvolvimento indeterminado.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o quadro clínico dos indivíduos com DI ou AGD indeterminado, residentes na Vila São José Cottolengo em Trindade, GO.
- Classificar, comparar e analisar estatisticamente os achados clínicos.
- Investigar, por meio do cariótipo, as alterações cromossômicas que possam existir nestes pacientes.
- Nos casos em que o cariótipo se apresente normal, investigar as regiões subteloméricas na busca de anormalidades cromossômicas.
- Nos indivíduos com análise citogenética sem anormalidades, identificar possíveis ganhos ou perdas cromossômicas patogênicas pela metodologia da análise cromossômica por microarranjos.
- Nos portadores de clínica compatível, realizar a investigação da Síndrome do X-Frágil.
- Estabelecer, quando possível, a correlação genótipo-fenótipo dos pacientes.

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística e Metodologia da Avaliação Clínica

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás e aprovado segundo o protocolo 43747315.1.0000.5083 (Anexo 1).

A casuística foi composta por 48 indivíduos com diagnóstico de Deficiência Intelectual, com idade até 25 anos e institucionalizados na Vila São José Bento Cottolengo (VSJBC), em Trindade-Goiás. Estes internos estão sob a tutela e guarda da instituição, que é sua responsável legal. Os seus gestores autorizaram a participação dos pacientes na pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Um total de 12 participantes, que ainda possuía vínculo familiar, tiveram seus parentes contatados. Estes foram apresentados à pesquisa, convidados a participar do estudo, a responderem perguntas sobre os seus entes (gravidez, parto, desenvolvimento, entre outras).

Os pacientes foram atendidos por clínicos gerais e pediatras que, com o auxílio de uma ficha de anamnese padrão, levantaram os dados sociodemográficos, antropométricos e clínicos (Anexo 3). Os dados sociodemográficos pesquisados foram a data e o local de nascimento, o sexo e a presença ou não de contato familiar. Os dados antropométricos levantados foram o peso, a altura, o índice de massa corporal e o perímetro craniano. Estas informações foram classificadas conforme as curvas de percentis e escore Z da OMS e do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) (Quadro 3).

A ficha de avaliação clínica continha perguntas sobre as condições de vida dos pacientes no período pré-natal, perinatal e infância. Sobre o período pré-natal, foi questionada a condição social na qual ocorreu a gestação, o uso pela mãe de substâncias teratogênicas e sobre doenças maternas na gravidez. No período perinatal, foram levantadas possíveis intercorrências desencadeantes da DI, como a prematuridade, anóxia peri-parto, entre outras.

Em relação à infância, foi pesquisada a ocorrência de infecções graves, acidentes com traumatismo cranioencefálico e outros eventos (Anexo 4).

Quadro 3 - Curvas de percentis e escore Z utilizadas na classificação dos dados antropométricos dos pacientes do estudo.

Parâmetro	Curvas utilizadas
Peso	CDC (2000) e OMS (2007)
Altura	CDC (2000) e OMS (2007)
IMC	CDC (2000), OMS (2007) e Quetelet (1835)

CDC: Center of Diseases Control e OMS: Organização Mundial da Saúde.

Os participantes do estudo tiveram o seu desenvolvimento neuropsicomotor avaliado, por meio do questionamento sobre a aquisição de funções motoras e cognitivas (firmar o pescoço, sentar, andar, falar, entre outros) e a idade na qual desenvolveram tais habilidades (Anexo 4).

Os examinadores realizaram um exame físico detalhado, que compreendeu os principais órgãos e sistemas do corpo. A parte da ficha de avaliação clínica que se referia à coleta de informações de âmbito genético, foi formulada seguindo os critérios De Vries e colaboradores (2005) e incluía dados relativos à ocorrência familiar de doenças genéticas, evidências pré-natais de alterações no desenvolvimento, anormalidades no crescimento pós-natal, presença de dismorfismos faciais, de dismorfismos não faciais e de outras malformações congênitas (Anexo 4).

Os familiares foram questionados sobre a ocorrência familiar da DI, quando do relato de indivíduos acometidos e estes foram avaliados segundo os critérios diagnóstico da DI. Estes parâmetros obrigatórios foram o início dos sintomas na infância e o comprometimento dos três domínios do intelecto (conceitual, social e prático). No nosso estudo, a DI foi considerada familiar quando, pelo menos, um segundo componente da família foi afetado (Anexo 4).

Uma avaliação radiológica e laboratorial foi realizada nestes indivíduos e englobava os exames de tomografia computadorizada de crânio, radiografia de tórax, ultrassonografia de abdome, hemograma, exame de urina para elementos anormais e sedimentoscopia, dosagem do hormônio tireoestimulante, da aspartato aminotransferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT), da ureia, da creatinina, da glicemia de jejum e dos eletrólitos séricos (sódio, potássio, fósforo, cloro, magnésio e cálcio).

Todos os 48 participantes do estudo foram avaliados pelos neurologistas da instituição, na busca de diagnósticos que pudessem excluí-los do estudo e para retificar ou adicionar dados clínicos àqueles coletados pelos médicos da VSJBC. Ao final da avaliação multiprofissional, foram excluídos do estudo 21 indivíduos que apresentaram dados clínicos insuficientes ou com DI de etiologia infecciosa, metabólica, traumática, obstrutiva, por drogas teratogênicas e hipoxicoisquêmica (Figura 2).

Nos 27 pacientes com o diagnóstico de DI de etiologia indeterminada, uma equipe de psicólogos e neuropsicólogos realizou a classificação da gravidade da DI pelas diretrizes do DSM5 (leve, moderada, grave e profunda). A ferramenta utilizada para esta gradação foi o Inventário *Portage*, auxiliado pelos critérios clínicos (Figura 2). Quando suas manifestações clínicas estavam presentes, a equipe de psicologia também auxiliou no diagnóstico e classificação do Transtorno do Espectro Autista (TEA) (APA, 2013).

4.2. Coleta das Amostras Biológicas e Análises Genéticas

A coleta de sangue periférico dos participantes foi realizada pelos profissionais do laboratório da VSJBC. Durante esse procedimento, uma amostra de 6ml de sangue foi coletada e destinada às análises genéticas. Este material foi separado em duas alíquotas: à primeira porção foi adicionada heparina sódica (BD Vacutainer Sodium Heparin 143 USP Unit) e encaminhada para exames de citogenética clássica; à segunda porção foi adicionada o anticoagulante EDTA (BD Vacutainer K2 EDTA 7,2 mg) e direcionada para a extração do DNA.

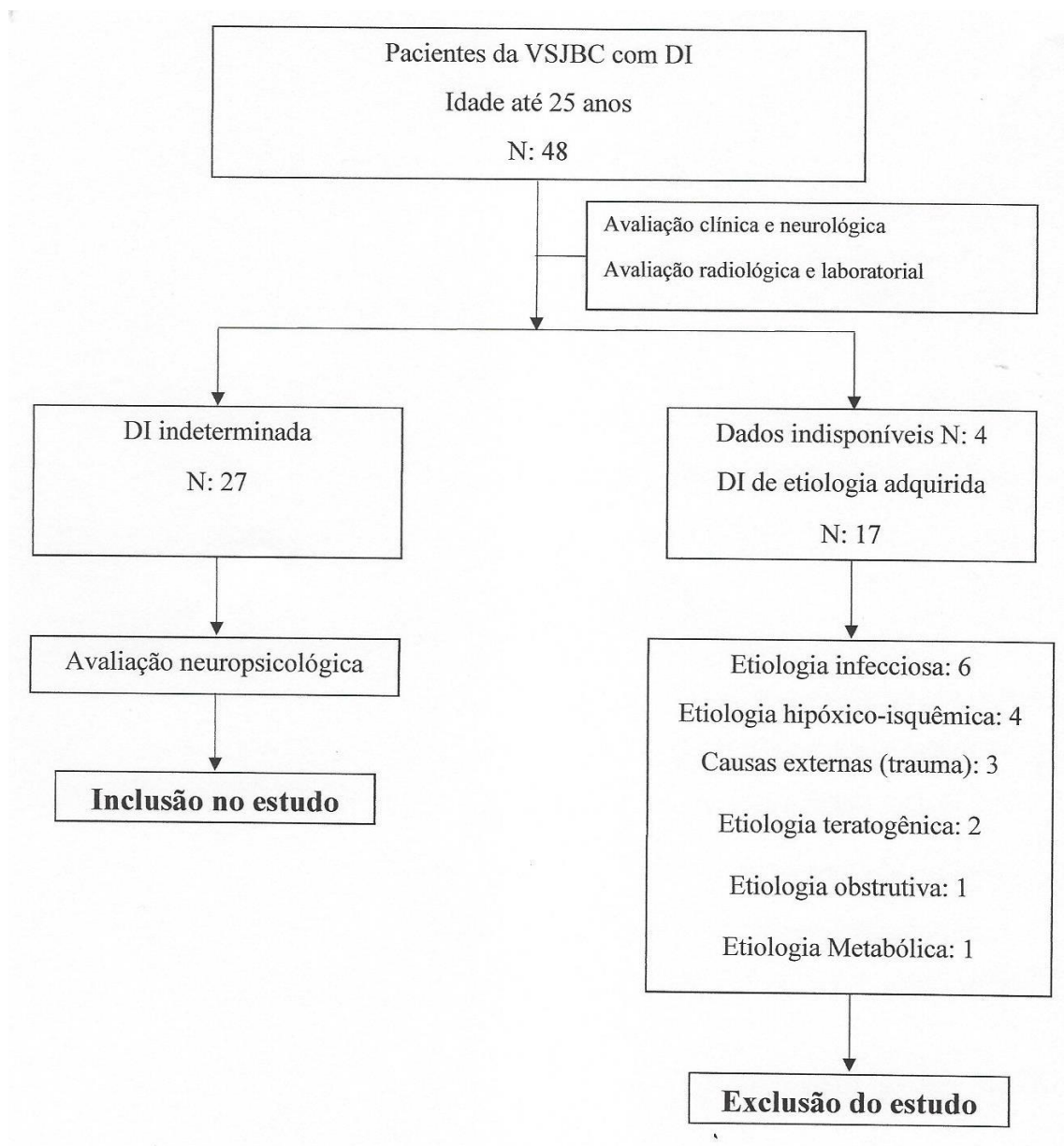
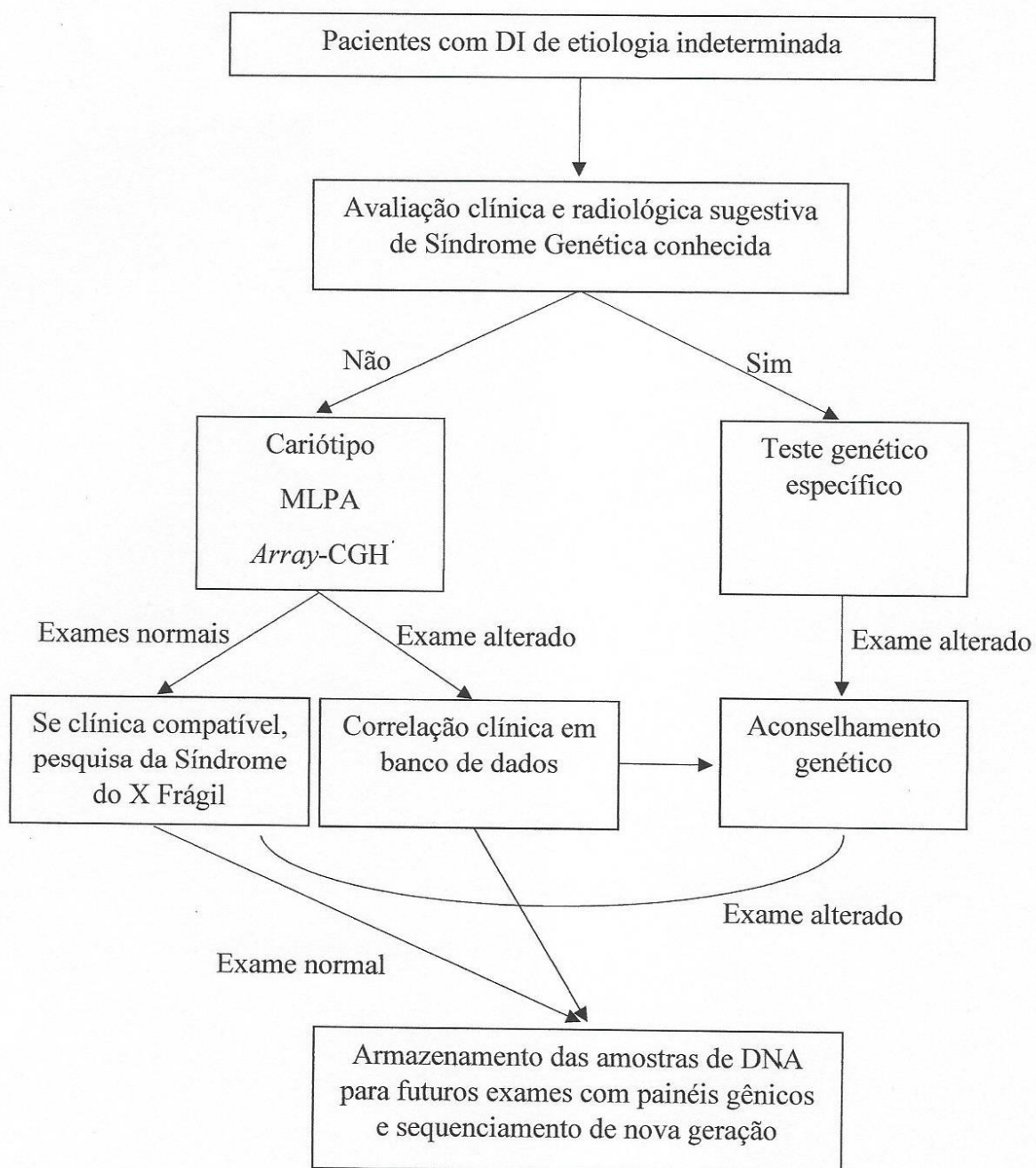


Figura 2 - Fluxograma da seleção dos pacientes para o estudo.



Fonte: Modificado de Flore e Milunsky (2012).

Figura 3 - Fluxograma para a realização dos exames genéticos dos pacientes com Deficiência Intelectual indeterminada.

As amostras foram utilizadas conforme o fluxograma acima. Primeiramente, nos indivíduos que apresentaram sinais e sintomas sugestivos de uma síndrome genética conhecida, os testes específicos para estas alterações foram realizados. Naqueles pacientes sem síndrome identificável, o exame de cariótipo, a MLPA e a análise cromossômica por microarranjos foram realizadas. A PCR para a Síndrome do X-Frágil foi realizada somente naqueles pacientes, cujos exames iniciais foram negativos e que apresentaram quadro clínico compatível com a doença. (Figura 3) (FLORE & MILUNSKY, 2012; AUTISM SPECTRUM DISORDERS WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM, 2017).

4.3. Citogenética Clássica (Cariótipo)

Linfócitos do sangue periférico das amostras coletadas foram cultivados de acordo com o protocolo de Moorheade e colaboradores (1960). Os passos do cultivo e as alterações feitas ao protocolo original estão descritas a seguir.

As células (500µl de sangue) foram cultivadas em duplicatas (frasco A e B), em 80% de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementados com estreptomicina (Sigma® 0,01mg/ml) e penicilina (Sigma 0,005mg/ml), 20% de soro bovino fetal (Gibco®) e 0,1% de fitohemaglutinina (Gibco®), perfazendo um total de 5ml. As culturas foram incubadas a 37°C por 72 horas para a análise das alterações cromossômicas. Ao término do prazo foi adicionado colchicina (0,4µg/ml, Sigma®) para a obtenção de células em metáfase, com tempo de ação de 40 minutos a 37°C. Em seguida, as culturas de linfócitos foram transferidas para tubos e centrifugadas a 800 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado; ao precipitado de células foram adicionados 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075M, Merck®) e incubados a 37°C por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado 1ml de solução fixadora (metanol/ácido acético, Merck®) na proporção de 3:1 e, então, o material foi homogeneizado com o uso da pipeta de “Pasteur”. Esta suspensão foi novamente centrifugada a 800 rpm por 8 minutos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido com a solução fixadora até que o material ficasse transparente e repetida por cerca de três

vezes. A cada repetição adicionou-se 5ml de solução fixadora e no último ciclo adicionou-se 1ml de fixador ao precipitado de células.

As lâminas foram limpas com água e detergente, enxaguadas em água corrente abundante, imersas em água destilada gelada e utilizadas logo em seguida. A suspensão de células foi gotejada sobre as lâminas, que foram acondicionadas em caixas fechadas e mantidas à temperatura ambiente por uma semana, para que, desta forma, ocorresse o envelhecimento da cromatina antes dos procedimentos de bandejamento.

As lâminas contendo as metáfases para análise foram submetidas aos procedimentos de bandejamento GTG, segundo um protocolo modificado de Scheres (1972). Estas foram submersas por 5 a 10 segundos em solução de tripsina 1:250 (0,1% Gibco) pré-aquecida a 37°C e lavadas com água destilada. A seguir, as lâminas foram coradas com solução contendo 1ml de Giemsa (Merck®) e 30ml de tampão fosfato de Sorensen (0,06M pH 6,8) por 3 minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Um total de onze metáfases foi desenhada e analisada no microscópio ótico. As fórmulas cariotípicas foram descritas de acordo com o ISCN (2009).

4.4. Análise das Regiões Subteloméricas (MLPA)

A extração de DNA genômico a partir das amostras de sangue periférico (coletado em tubos vacutainer com EDTA) foi realizada segundo as recomendações do fabricante do kit comercial Flexigene Genômica Purificativo Kit (Qiagen®). O DNA obtido foi quantificado por absorbância da luz UV em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Científico Inc.) para determinar sua concentração e, então, estocado a -20°C até o momento da utilização.

A análise de rearranjos pela técnica de MLPA foi realizada utilizando-se o kit SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix – Versão E2, seguindo as instruções do fabricante (MRC-Holland). A técnica de MLPA foi realizada segundo o protocolo original descrito por Schouten e colaboradores (2002), com pequenas modificações que são descritas a seguir.

As amostras de DNA foram diluídas (concentração final 50ng/μl) em Tris-EDTA. Para a desnaturação do DNA 1μl de cada amostra diluída foi colocada em tubos de 0,2ml, submetidas a 98°C por cinco minutos, em seguida a 25°C e centrifugadas 30 segundos a 13.000 rpm. Após esse processo, foi acrescentado 1μl do Master Mix I a cada tubo (0,375μl do SALSA Probemix 1; 0,375μl do SALSA buffer e 0,25μl de água ultrapura), incubados a 95°C por um minuto, em seguida a 60°C por 3 horas e permanecendo a 54°C no termociclador. Ainda nessa temperatura foram adicionados 8μl de mix ligase-65 às amostras (6,25μl de água ultrapura, 0,75μl de ligase buffer A; 0,75μl de ligase buffer B e 0,25μl de ligase), que foram incubadas por 15 minutos, em seguida a 98°C por 5 minutos e depois a 4°C.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi iniciada a uma temperatura de 60°C, onde foram adicionados 20μl do Master Mix II a cada tubo (15,75μl de água estéril, 2μl de SALSA PCR, 1μl de PCR buffer, 1μl do primer e 0,25μl de taq DNA polimerase), misturados por pipetagem e imediatamente iniciada a reação de PCR nas seguintes condições: 35 ciclos – desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, extensão final a 72°C por 20 minutos e término a 4°C.

Os produtos amplificados obtidos foram analisados em uma placa de sequenciamento, onde foram adicionados 1,0μl do produto da PCR (diluído 1:20), 0,075μl de size standard LIZ600 (Applied Biosystems) e/ou ROX500 (Applied Biosystems) e 9μl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems). Estes foram desnaturados a 96°C por 3 minutos, incubados em banho de gelo por 3 minutos e separados por tamanho em sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas foram analisados usando o software de análise de genótipo Coffalyser (MRC-Holland), em planilhas específicas para o Kit SALSA MLPA, desenvolvidas e fornecidas on line pela MRC-Holland (fabricante do kit de MLPA). A aplicação desse software integra todas as etapas de análise, fornecendo opções de normalização e de relatórios personalizados de pesquisa clínica (identificação da amostra, parâmetros de análise, gráfico e eletroferograma).

Quantidades relativas dos produtos de sondas amplificadas foram comparadas com a amostra de referência para se determinar o número de cópias das sequências alvo. O software determina a relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controle. Os picos de interesse foram considerados como sendo normais quando a razão entre essas áreas estava entre 0,75 e 1,3. As razões com valores inferiores a 0,75 e acima de 1,3, em várias sondas adjacentes, indicaram a presença de uma deleção ou duplicação, respectivamente (SCHOUTEN et al, 2002).

As regiões subteloméricas pesquisadas pelo kit SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix – Versão E2, com os genes localizados nestas regiões que foram correlacionados com a Deficiência Intelectual, estão descritos no Quadro 4.

4.5. Análise Cromossômica por Microarranjos

A análise cromossômica por microarranjos permite analisar microdeleções ou microduplicações, simultaneamente, em milhares de sequências alvo do genoma. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em alta densidade em um chip de DNA. Utilizamos a plataforma CytoScan 750 (Affymetrix, EUA) e as configurações disponíveis no GeneChip® Scanner 3000 7G System (Affymetrix, EUA). Essa plataforma utiliza microarranjos de DNA contendo 2 milhões de sondas não polimórficas para Copy number variations (CNVs) de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano e cerca de 750.000 SNPs. O sistema todo inclui os oligonucleotídeos pré-arranjados em GeneChip®, conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridização, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e programa computacional necessário para a identificação dos Single nucleotide polymorphisms (SNPs) e das CNVs. A técnica consistiu das seguintes etapas:

Preparação do DNA genômico: seguindo os padrões recomendados pelo fabricante quanto à estrutura de trabalho, condições e materiais utilizados foi dada sequência ao protocolo para a análise das amostras, que teve início com a normalização das amostras para a concentração final de 50 ng/μL de DNA

diluído em Low EDTA TE buffer (Affymetrix, EUA). Utilizou-se o protocolo estabelecido para grupo de 8 reações contando com 6 amostras, um controle positivo e um controle negativo.

Quadro 4 - Regiões subteloméricas pesquisadas pelo kit SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix – Versão E2 e os genes correlacionados com a DI localizados nestas regiões.

Posição	Gene DI
01p36.33	TNFRSF4
02p25.3	ACP1
03p26.3	CHL1
04p16.3	PIGG
05p15.33	PDCD6
06p25.3	IRF4
07p22.3	ADAP1
08p23.3	FBXO25
09p24.3	DMRT1
10p15.3	DIP2C
11p15.5	RIC8A
12p13.33	SLC6A12
13q12.11	PSPC1
14q11.2	CCNB1IP1
15q11.2	MKRN3
16p13.3	POLR3K
17p13.3	RPH3AL
18p11.32	USP14
19p13.3	CDC34
20p13	SOX12
21q11.2	RBM11
22q11.21	BID
Xp22	SHOX

Posição	Gene DI
01q44	SH3BP5L
02q37.3	CAPN10
03q29	BDH1
04q35.2	TRIML2
05q35.3	GNB2L1
06q27	PSMB1
07q36.3	VIPR2
08q24.3	ZC3H3
09q34.3	EHMT1
10q26.3	PAOX
11q25	NCAPD3
12q24.33	ZNF10
13q34	F7
14q32.33	MTA1
15q26.3	ALDH1A3
16q24.3	GAS8
17q25.3	TBCD
18q23	RBFA
19q13.43	CHMP2A
20q13.33	OPRL1
21q22.3	PRMT2
22q13.33	RABL2B
Xq28	VAMP7

DI: Deficiência Intelectual. Fonte: Modificado de WWW.mlpa.com

Digestão com Nsp I, ligação de adaptadores e amplificação: DNAs dos pacientes e controles foram submetidos à digestão em sítios específicos com a enzima Nsp I (Affymetrix, EUA) para a obtenção de fragmentos de DNA de tamanhos variados e posterior ligação de adaptadores com a T4 DNA Ligase (Affymetrix, EUA), preparando a amostra para a amplificação por meio da reação da PCR.

Foi utilizada uma mistura de 5 µL de DNA (50ng/µL), 11,55 µL de água (Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water), 2,00 µL de tampão da Nsp I (10X), 0,20 µL de albumina bovina sérica (BSA) (100X) e 1,0µl da enzima Nsp I (10 U/µL). A seguir, a mistura foi colocada no termociclador MyCycler® (Bio-Rad, EUA) por duas horas a 37°C e 20 minutos a 65°C. Os produtos da digestão foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

A seguir, foi realizada a ligação dos fragmentos de DNA a adaptadores específicos, com a mistura de 0,75 µL de adaptador Nsp I (50 µM), 2,50 µL de tampão da T4 DNA Ligase (10X) e 2,00 µL da enzima T4 DNA Ligase (400 U/µL). A mistura foi colocada em termociclador (Bio-Rad, EUA) por três horas a 16°C e 20 minutos a 70°C. Os produtos da reação de ligação foram diluídos com 75µL de água e foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

Foram feitas quadruplicatas das reações da PCR de cada amostra para aumentar a quantidade do DNA genômico. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores Nsp I foram submetidos à reação de PCR com a utilização de 39,5µL de água, 10,0 µL de tampão da TITANIUM™ Taq DNA Polimerase(10X), 20,0 µL de reagente GC-Melt, 14,0 µL de mistura de dNTP's (2,5mM cada), 4,5µL do iniciador PCR Primer 002 (100µM) (Clontech, EUA) e 2,0 µL da enzima TITANIUM™ Taq DNA polimerase (50X) (Clontech, EUA). Foram colocadas em um termociclador Veriti™ onde as reações tinham 1 ciclo de incubação a 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos).

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos deve ser de cerca de 150 a 2000 pb, confirmando o sucesso da digestão, ligação e PCR, permitindo a sequência do protocolo. Os produtos das PCRs foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

Mistura dos produtos das PCRs, purificação e quantificação: os produtos das PCRs das quadruplicatas de cada amostra foram reunidos em um único tubo (volume final 397 μL) e os fragmentos de DNA foram capturados com o uso de esferas magnéticas (Affymetrix, EUA). Após incubação e centrifugação, as esferas magnéticas contendo fragmentos de DNA aderidos à sua superfície foram selecionadas por força magnética na MagnaRackTM (Life Technologies, EUA), lavadas com tampão da purificação (Affymetrix, EUA) e, finalmente, os DNAs eluídos em tampão de eluição (Affymetrix, EUA) para um volume final de 47 μL . O material foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue Plus. Para continuação do protocolo, cada amostra deve apresentar valores de concentração de DNA $\geq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os produtos das PCRs purificados foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

Fragmentação dos produtos das PCRs: os produtos das PCRs inicialmente foram misturados com 10 μL do mix de fragmentação que é cuidadosamente preparado com 123.5 μL de água, 158,4 μL de tampão de fragmentação 10x (Affymetrix, EUA) e 5,8 μL do reagente de fragmentação (2,5 U/ μL). A mistura foi colocada no termociclador VeritiTM por 35 minutos a 37°C e 15 minutos a 95°C . A fragmentação (volume final: 55 μL) foi observada pela presença de fragmentos entre 25 e 125 pb em eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. Os fragmentos obtidos foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

Marcação do DNA fragmentado com biotina: a marcação das amostras foi realizada com a mistura de 51 μL do DNA fragmentado e 19,5 μL da mistura de marcação formada por 14,0 μL de tampão Terminal deoxynucleotidyl Transferase (5X), 2,0 μL de reagente de marcação de DNA 30mM (biotina) e 3,5 μL da enzima TdT (30 U/ μL). A mistura foi colocada em um termociclador VeritiTM por quatro horas a 37°C e 15 minutos a 95°C . O DNA marcado com biotina foi armazenado a -20°C até o próximo passo.

Hibridização: primeiramente foi preparada a mistura de hibridização com os tampões de hibridização parte 1 (165,0 μL), parte 2 (15,0 μL), parte 3 (7,0 μL) e parte 4 (1,0 μL), mais 2,0 μL de OCR (Oligo Control Reagent, Affymetrix, EUA). Em seguida foi realizada a mistura de 70,5 μL de DNA biotinilado e 190 μL da mistura de hibridização. Esta mistura foi aquecida no termociclador VeritiTM a 95°C por 10 minutos e resfriada a 49°C até o próximo passo. Ainda no

termociclador, 200µl da mistura desnaturada foi depositada imediatamente em cada um dos GeneChip® com os oligonucleotídeos pré-arranjados. Os GeneChip® com o DNA foram incubados em forno de hibridização (modelo Hybridization Oven 645, Affymetrix, EUA) a 50°C durante 16 a 18 horas a 60 rpm.

Lavagens dos GeneChip® e marcação com fluoróforos: a lavagem e marcação dos GeneChip® foi realizada, quatro por vez, na estação automatizada Fluidics Station 450 (Affymetrix, EUA) que foi previamente abastecida com os tampões de lavagem A e lavagem B (Affymetrix, EUA) mais água deionizada. Foram preparados também os tubos separados contendo os tampões de marcação 1 (500 µL), 2 (500 µL) e 800 µL de holding buffer (Affymetrix, EUA) que apresentaram em suas formulações os elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina - SAPE e anticorpo biotilado antiestreptavidina) para a formação da fluorescência durante a leitura dos GeneChip® com o laser. Em seguida, os GeneChip® foram retirados do forno de hibridização e, imediatamente, colocados (quatro por vez) na estação fluídica onde as sequências de lavagens e marcações dos microarranjos contidos nos chips por fluoróforos são automatizadas sob controle do software Affymetrix GeneChip® Command Console™ (AGCC) versão 3.2.2 (Affymetrix, EUA).

Escaneamento dos GeneChip®, captação de imagens e análise no software Chromosome Analysis Suite 1.2.2 (Affymetrix®): os chips com microarranjos foram colocados no GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, EUA), gerenciado pelo programa AGCC. As imagens geradas pela excitação dos fluoróforos (ficoeritrina) captadas pelo digitalizador foram submetidas primeiramente à análise de controle de qualidade geral (QC) por meio do programa Genotyping Console versão 3.2.2 (Affymetrix, EUA). A imagem dessa leitura pode ser observada com o programa de visualização Affymetrix GeneChip Viewer (Affymetrix, EUA), onde também se puderam verificar os controles positivos do sistema de forma a se comprovar que as condições de hibridização do microarranjo foram adequadas.

Após estes procedimentos, utilizando o software Chromosome Analysis Suite (ChAS) versão 1.2.2 (Affymetrix, EUA) foi possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs, mosaicismo, perda de heterozigose) ao longo do genoma de cada amostra. O programa é oferecido

gratuitamente no sítio do fabricante (www.affymetrix.com) e trabalha com a interface do Windows 7. Ele permite analisar arquivos no formato .CEL gerados pelo software de leitura (Affymetrix CytoScan® Arrays) dos GeneChip®, visualizar os dados resultantes da análise da hibridização (arquivos CYCHP) sumarizados em forma de tabelas e gráficos, visualizar os dados (arquivos CNCHP) da plataforma (CytoScan™ HD Array) com a qual são comparados os dados das amostras. O software permite ainda criar e customizar parâmetros e regiões para uma análise específica, aplicar filtros para todo o genoma ou regiões de interesse específico para remover informações não relevantes, realizar análises comparativas entre diferentes amostras, além de acessar os principais bancos de dados externos (NCBI, UCSC Genome Browser, Ensembl, MIM®).

4.6. Pesquisa da Síndrome do X Frágil (PCR)

Naqueles pacientes que apresentavam quadro clínico compatível com a Síndrome do X-Frágil e, concomitantemente, apresentaram cariótipo, MLPA e análise cromossômica por microarranjos normais, foram realizadas reações de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação da região CGG do gene *FMR1*. Na reação de PCR foi utilizado *primer c* 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3' e o *primer f* 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'. A amplificação foi realizada num volume total de 25µl contendo entre 50-100 ng de DNA genômico, 0.75 pmol de cada primer, Deoxyribonucleotide triphosphate (DNTP) 200µM, 10 µl de 5x Q-solution (Qiagen), 2.5 µl de 10x PCR Buffer e 1u de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação consistiu de 34 ciclos iniciados com desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de desnaturação a 98°C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação da amplificação ou não do produto, utilizando 5µl do material amplificado, juntamente com 3µl de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 31% e glicerol 30%). Desta mistura, 8µl foram depositados em cada poço do gel, e no primeiro poço foi colocada alíquota padrão de peso molecular de 100 pb. O gel de agarose foi preparado a 1,5% de

concentração com 100 ml de tampão TBE (Tris – Borato – EDTA) 1x e 1,5g de agarose e 3µl de brometo de etídio 1mg/ml. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal contendo tampão TBE 1x para a corrida à 100V e 50A por aproximadamente 30 minutos. Todos os géis foram fotografados em fotodocumentador e as fotos mantidas em ata para registro dos resultados das amostras.

4.7. Análise Estatística

As manifestações clínicas foram organizadas em tabelas de distribuição de frequência e, após a tabulação, analisadas pelo teste de Qui-quadrado, teste de razão de verossimilhança para o coeficiente da regressão logística e o teste exato de Fisher, com um P de 5% de significância. Em uma situação pontual, foi definido um P de 10% de significância. Os cálculos foram checados por dois examinadores para a exclusão de possíveis erros na sua operação.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação Clínica

Após a avaliação clínica e os exames de neuroimagem, um total de 21 indivíduos com DI foi excluído do estudo, em decorrência de apresentarem dados clínicos insuficientes ou DI de etiologia infecciosa, metabólica, traumática, obstrutiva, por drogas teratogênicas e hipoxicoisquêmica. Outros 27 pacientes apresentaram Deficiência Intelectual de etiologia indeterminada e, portanto, foram incluídos na nossa casuística. As informações dos 27 casos do estudo foram organizadas em um quadro, que continha os dados sobre o sexo, procedência, idade, nível de gravidade da DI, associação com TEA, familiares acometidos, perímetro craniano, peso, altura e IMC destes (Anexo 4).

5.1.1. Características Sociodemográficas e Familiares

A idade média da amostra foi de 16,8 anos, com um desvio padrão de 5,68 anos. A amostra não continha lactentes, apresentava um pré-escolar, dois escolares, 15 adolescentes e nove adultos jovens (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes com Deficiência Intelectual indeterminada por fases da vida.

Fases da vida	Número de casos	Percentual
Pré-escolar (2-7 anos)	1	3,7 %
Escolar (7-10 anos)	2	7,4 %
Adolescentes (10 a 20 anos)	15	55,6 %
Adultos jovens (20-25 anos)	9	33.3 %
Total	27	100.0 %

O sexo masculino foi observado em 15 (55,55%) dos indivíduos do estudo e o sexo feminino em 12 (44,45%). Não foi evidenciada diferença significativa entre os percentuais do sexo dos pacientes ($P= 0,4936$).

Em relação à origem dos indivíduos, 3,7% eram oriundos da região norte, 7,41% da região nordeste, 3,7% da região sudeste e 85,14% da região centro-oeste. A história familiar de DI foi descrita em 62,96% dos casos (25,93% apenas um familiar e 37,03% dois ou mais familiares), não relatada em 22,22% e dados sobre o acometimento familiar não foram obtidos em 14,82% destes (Figura 4).

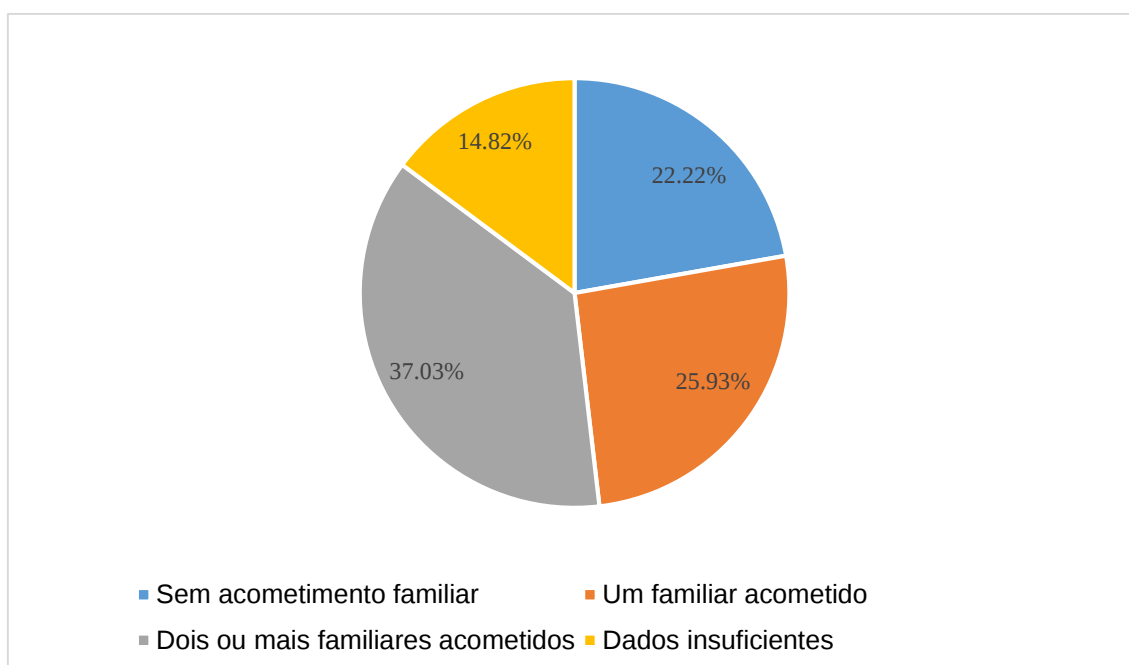


Figura 4 – Frequência do acometimento familiar na amostra.

5.1.2. Classificação da DI

Quanto ao tipo de DI, um paciente apresentou DI não síndrômica (3,7%) e os outros 26 (96,3%) apresentaram DI síndrômica. Os indivíduos com DI síndrômica manifestavam, concomitantemente, alguma malformação, desordem do neurodesenvolvimento (DND) e/ou outra deficiência. A DI foi classificada quanto a sua gravidade conforme o DSM5 e as ferramentas utilizadas para o seu

diagnóstico foram o inventário *Portage* e a avaliação clínica. Nenhum indivíduo avaliado apresentou DI leve, cinco apresentaram DI moderada (18,52%), nove apresentaram DI grave (33,33%) e 13 apresentaram DI profunda (48,15%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição da frequência absoluta e relativa do nível de gravidade da Deficiência Intelectual dos pacientes em função do sexo.

Gravidade	Sexo		Total
	M	F	
Moderada	0 (0,0%)	5 (41,7%)	5 (18.5%)
Grave	6 (40,0%)	3 (25,0%)	9 (33.3%)
Profunda	9 (60,0%)	4 (33.3%)	13 (48.2%)
Total	15 (100%)	12 (100%)	27 (100%)

5.1.3. Avaliação Antropométrica

A avaliação antropométrica foi feita com a medição da altura, peso e cálculo do IMC. A estatura foi medida e classificada conforme as tabelas da OMS e do *Center of Diseases Control* (CDC). Baixa estatura (BE) foi observada em 14 pacientes (51,85%), limítrofe para baixa estatura em quatro (14,82%) e estatura adequada em nove (33,33%).

Os participantes da pesquisa foram pesados e classificados segundo as curvas da OMS e do CDC. O baixo peso (BP) foi encontrado em 16 casos (59,26%), o peso adequado em oito (29,63%) e a obesidade em três (11,11%). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado e analisado segundo as tabelas da OMS e do CDC. O IMC baixo foi encontrado em 13 casos (48,15%), o adequado em 11 (40,74%) e o elevado em três (11,11%). As frequências relativas, originadas da avaliação e classificação dos parâmetros ponderoestaturais dos pacientes, estão demonstradas na Figura 5.

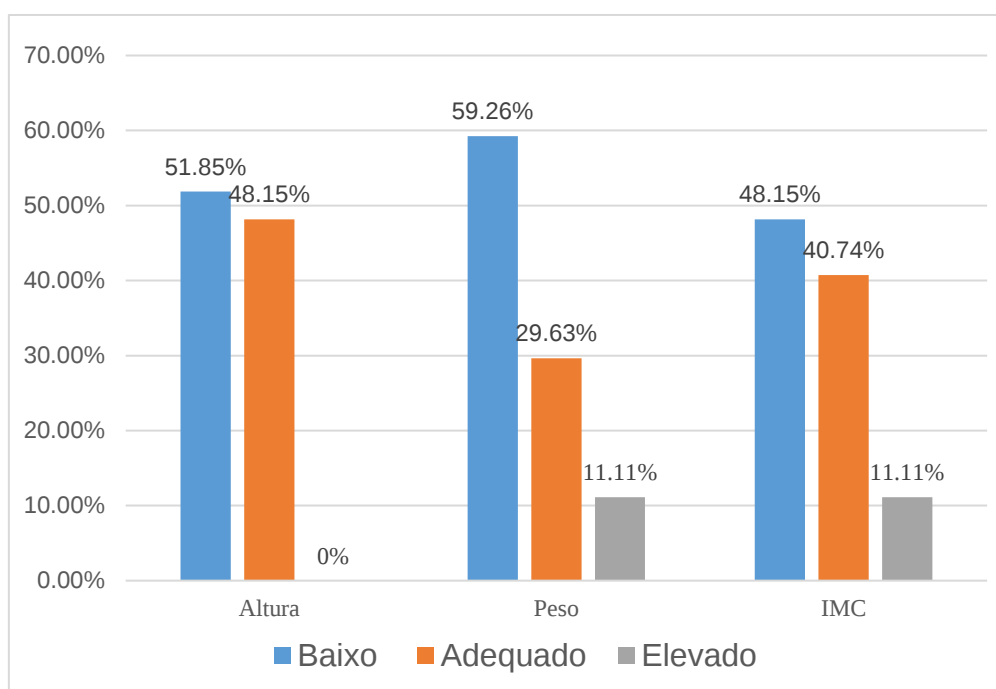


Figura 5 – Frequências relativas encontradas na avaliação e classificação dos parâmetros pôndero-estaturais dos pacientes da amostra.

O perímetro craniano (PC) foi mensurado e classificado segundo os estudos de Rollins, Collins e Holden (2010) (Anexo 5). Os pacientes apresentaram perímetro craniano menor que o percentil 3 em 13 casos (48,15%) (microcefalia), entre o percentil 3 e 10 em quatro casos (14,81%) (limítrofe para microcefalia) e entre o percentil 10 e 97 em 10 casos (37,04%) (adequado).

5.1.4. Comorbidades na DI Sindrômica

Os pacientes com DI exibiram uma grande variedade de sinais e sintomas, porém, o sistema mais amplamente afetado foi o SNC. Um total de 18 casos (66,67%) apresentou deficiências múltiplas (duas ou mais), alguns destes exibindo todos os quatro tipos principais de deficiência (intelectual, física, visual e auditiva). Dezesete pacientes apresentavam deficiência física (paralisia cerebral espástica, paralisia flácida de membros inferiores, ataxia e paralisia facial), oito Deficiência Auditiva e sete Deficiência Visual (Anexo 6).

As desordens do neurodesenvolvimento compreendem a Deficiência Intelectual, o Atraso Global no Desenvolvimento, o Transtorno do Espectro Autista (TEA) e a Epilepsia. O diagnóstico de TEA esteve concomitante ao de DI em cinco indivíduos (18,52%), estes, na sua maioria, com os níveis graves do Autismo. A Epilepsia esteve presente em 15 casos (55,55%), principalmente, na sua forma de difícil controle, onde numerosos anticonvulsivantes foram necessários para o seu controle.

Um total de 13 pacientes (48,15%) apresentou malformações do Sistema Nervoso Central, com grande diversidade morfológica e afetando tanto a medula espinhal quanto o encéfalo. A avaliação radiológica, com tomografias computadorizadas de crânio de todos os indivíduos, auxiliou na descrição destas alterações. As malformações encontradas são descritas no Quadro 5.

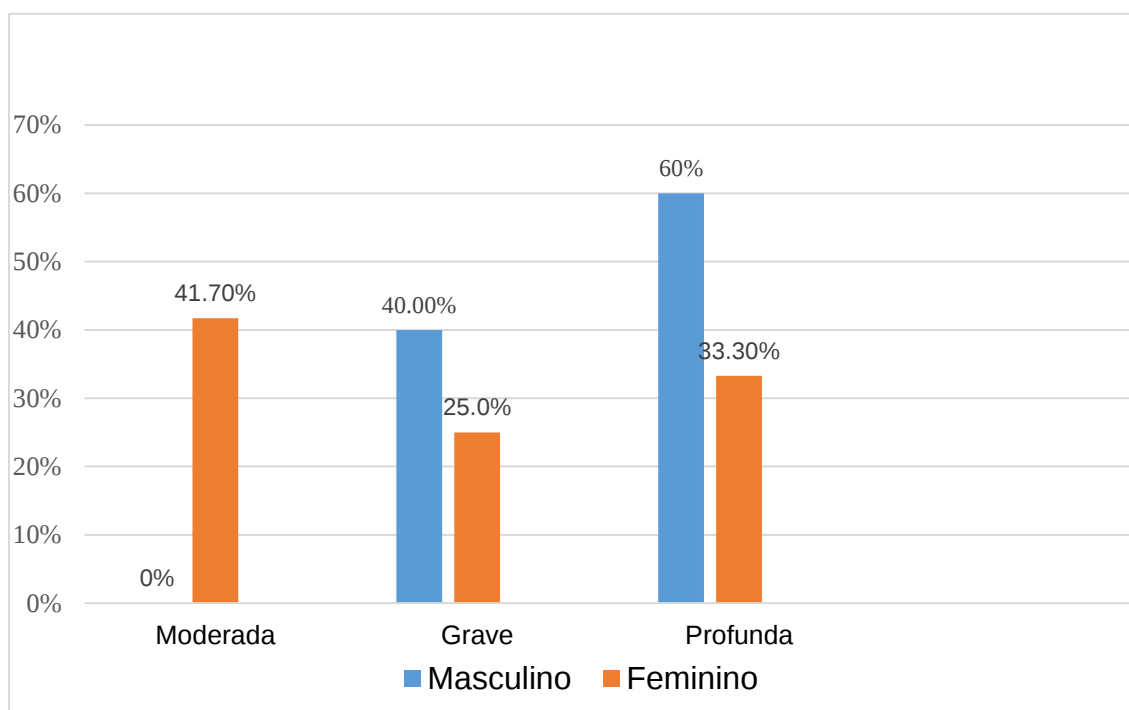
Quadro 5 - Descrição das malformações do Sistema Nervoso Central encontradas nos pacientes do estudo.

Paciente	Malformação Neurológica
6	Hidranencefalia
7	Paquigiria e agenesia de septo pelúcido
11	Atrofia cerebral
12	Síndrome de Dandy-Walker
14	Hidranencefalia
16	Meningomielocele + Hidrocefalia + Agenesia de sépto pelúcido
17	Meningomielocele + Hidrocefalia
18	Hidranencefalia
19	Displasia septo-óptica
20	Hidroanencefalia
24	Esquisencefalia de lábio aberto + Paquigiria/polimicrogria
26	Meningomielocele + Hidrocefalia
27	Agenesia de corpo caloso

Malformações faciais e cutâneas foram observadas em nove casos (33,33%), malformações em ossos e membros em quatro casos (14,81%) e malformação renal em um caso (3,7%). Os exames laboratoriais usuais evidenciaram diabetes mellitus congênita em um paciente (3,7%), pan-hipopituitarismo em outro (3,7%) e os demais tiveram resultados normais (Anexo 6).

5.1.5. Associações entre a Gravidade da DI e as Demais Informações Pesquisadas

Quando os participantes do estudo foram separados pelo sexo em função do nível de gravidade, houve diferença entre as distribuições de frequência. Maior número de casos moderados em indivíduos do sexo feminino e maior número de casos graves e profundos em pacientes do sexo masculino foram descritos ($P=0,0214$) (Figura 6).



*Frequências estatisticamente diferentes pelo Teste de Qui-quadrado ($P= 0.0214$).

Figura 6 – Distribuição da frequência relativa do nível de gravidade da Deficiência Intelectual dos pacientes em função do sexo.

Os pacientes com estatura e IMC abaixo do esperado foram distribuídos de acordo com o nível de gravidade da DI. Em relação à altura, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes nas frequências, porém, os indivíduos com DI profunda apresentaram uma tendência a terem mais baixa estatura, do que aqueles com DI grave e moderada. As frequências relativas ao IMC baixo foram estatisticamente diferentes, de forma que, quanto maior o nível de gravidade da DI encontrada, maior a ocorrência de pacientes com IMC abaixo do esperado (Tabela 3). Em três mulheres com DI moderada observamos obesidade (60%), que não foi visualizada nos homens e nos indivíduos com as formas graves de DI.

Tabela 3 - Frequências absolutas e relativas de indivíduos com baixa estatura e índice de massa corpórea baixa, de acordo com os níveis de gravidade da Deficiência Intelectual.

Número de pacientes	Gravidade da DI			Total
	Moderada 5	Grave 9	Profunda 13	
Antropometria				
Baixa estatura	2 (40%)*	3 (33.33%)*	9 (69.23%)*	14 (51.85%)
Baixo peso pelo IMC	0 (0%)**	3 (33.33%)**	10 (76.92%)**	13 (48.15%)

* Frequências sem diferença estatística significativa, Qui-quadrado (P = 0.2133) e Fisher (P = 0,2095).

** Frequências com diferença estatística significativa, Qui-quadrado (P = 0.0077) e Fisher (P = 0,0049).

A Tabela 4 apresenta a distribuição das frequências dos pacientes com desordens do neurodesenvolvimento, deficiências múltiplas, malformações diversas e outras alterações, em função do nível de gravidade da Deficiência Intelectual. As frequências com ocorrência muito baixa estão relatadas na tabela, porém, com avaliação estatística de baixo poder de conclusão. Aquelas com ocorrência suficiente, a análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-quadrado, pelo teste exato de Fisher e pelo teste de razão de verossimilhança para o coeficiente da regressão logística da probabilidade de ocorrência em função da gravidade da DI (CRLG), todos com um P de 5% de significância.

Tabela 4 - Distribuição das frequências dos pacientes com desordens do neurodesenvolvimento, deficiências múltiplas, malformações diversas e outras alterações, em função do nível de gravidade da Deficiência Intelectual.

Número de pacientes	Gravidade da DI						Total
	Moderada 5	Grave 9	Profunda 13				
Outras deficiências				X² (P)	Fisher (P)	CRLG (P)	
Paralisia cerebral	0 (0%)	2 (22.22%)	9 (69.23%)	0,0106	0,0135	0,0111	11 (40.74%)
Paralisia flácida de membros inferiores	1 (20%)	2 (22.22%)	1 (7.69%)	0,6004	---	---	4 (14.81%)
Ataxia	0 (0%)	0 (0%)	1 (7.69%)	0,5717	---	---	1 (3.70%)
Paralisia facial bilateral	0 (0%)	0 (0%)	1 (7.69%)	0,5717	---	---	1 (3.70%)
Deficiência Auditiva	0 (0%)	2 (22.22%)	6 (46.15%)	0,1324	0,1297	0,0667	8 (29.63%)
Deficiência Visual	0 (0%)	1 (11.11%)	6 (46.15%)	0,0624	0,0976	0,0547	7 (25.93%)
Desordens do neurodesenvolvimento							
Epilepsia	1 (20%)	5 (55.55%)	10 (76.92%)	0,0853	0,0871	0,0315	16 (59,25%)
TEA	0 (0%)	3 (33,33%)	2 (15,38%)	0,2822	---	---	5 (18.52%)

continua

Tabela 4 - Distribuição das frequências dos pacientes com desordens do neurodesenvolvimento, deficiências múltiplas, malformações diversas e outras alterações, em função do nível de gravidade da Deficiência Intelectual.

continuação

Número de pacientes	Gravidade da DI						Total
	Moderada 5	Grave 9	Profunda 13				
Malformações				X² (P)	Fisher (P)	CRLG (P)	
Microcefalia	2 (40%)	4 (44.44%)	7 (53.85%)	0,8388	1	0,5627	13 (48.15%)
Malformação de SNC	1 (20%)	5 (55.55%)	7 (53.85%)	0,3765	0,5239	0,2840	13 (48.15%)
Dismorfismos faciais e cutâneos	3 (60%)	2 (22.22%)	4 (30.76%)	0,3432	---	---	9 (33,33%)
Malformação de ossos e membros	1 (20%)	2 (22.22%)	1 (7.69%)	0,6004	---	---	4 (14.81%)
Malformações de órgãos	0 (0%)	1 (11.11%)	0 (0%)	0,3540	---	---	1 (3.70%)
Outras alterações							
Hipotonia	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0,1018	---	---	1 (3.70%)
Hipopituitarismo	0 (0%)	1 (11.11%)	0 (0%)	0,3540	---	---	1 (3.70%)
Diabetes mellitus tipo I	0 (0%)	0 (0%)	1 (7.69%)	0,5717	---	---	1 (3.70%)

X²: Qui-quadrado; CRLG: Coeficiente da regressão logística da gravidade e TEA: Transtorno do Espectro Autista.

Entre as desordens do neurodesenvolvimento, a Epilepsia teve uma maior ocorrência nas DI mais graves, ratificada pelo teste CRLG. A taxa de pacientes com TEA não apresentou diferenças significativas entre os diferentes níveis de gravidade da DI (Tabela 4).

Em relação às deficiências múltiplas, foi observada uma maior proporção de casos com Paralisia Cerebral nas DI de maior gravidade. A Deficiência Auditiva e Visual apresentou uma tendência de elevação das suas frequências em função do aumento da gravidade da DI, com significância estatística marginal. Na Deficiência Visual os testes estatísticos encontraram um P entre 0,0547 e 0,0976, ou seja, significativo para um $P = 10\%$, uma significância aceitável para o tamanho de nossa amostra (Tabela 4).

Não foram encontradas diferenças entre as classes de gravidade da DI, para a ocorrência da microcefalia, das malformações do SNC, dos dismorfismos faciais e cutâneos e das malformações de ossos e membros (Tabela 4).

5.1.6. Caso Suspeito de Ataxia Espinocerebelar Tipo 7

O paciente 25 da nossa amostra recebeu o diagnóstico clínico de ataxia espinocerebelar tipo 7 (Anexo 6). A avaliação revelou uma encefalopatia crônica evolutiva com sinais de ataxia, microcefalia, Deficiência Intelectual grave, Deficiência Visual, Epilepsia e disfagia orofaríngea neurogênica leve. Os dados gestacionais informaram que o nascimento foi a termo, com peso de 3850g e 53cm de comprimento, ambos adequados para a idade gestacional. O parto foi normal e não há relatos de uso de álcool, tabaco, medicamentos ou drogas ilícitas durante a gestação.

Após pesquisa dos seus antecedentes, vários membros da sua família foram identificados com a mesma doença (Figura 7) e foi realizada a investigação para determinar o número de repetições CAG nos seus genes *ATAXIN-7*. A avó materna (II-1) e a mãe da criança (III-1) apresentaram alelos com 44 e 46 repetições, respectivamente. O irmão da avó (II-4) apresentou alelo com 42 repetições. A partir de 36 repetições, considera-se o alelo mutado. A

amostra deste participante foi enviada para um laboratório terceirizado e a análise do número de repetições no gene *ATAXIN-7* (IV-2) teve resultado inconclusivo.

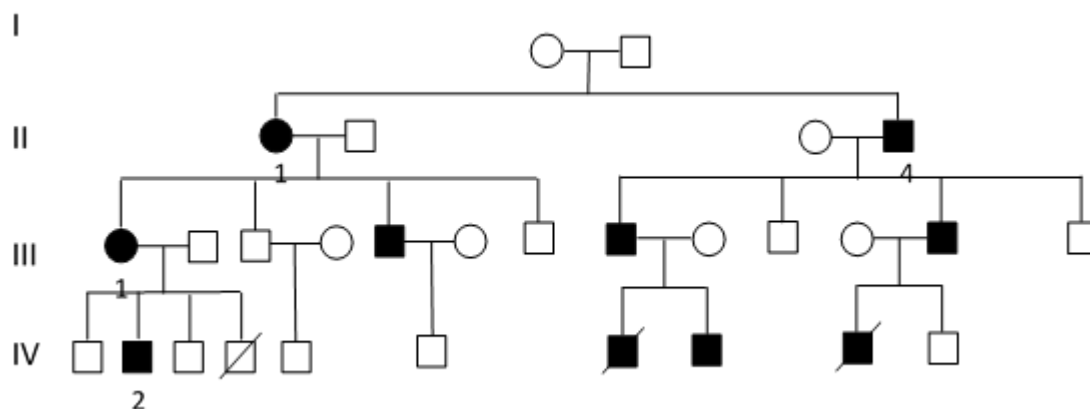


Figura 7 - Heredograma da família com diagnóstico de ataxia espinocerebelar tipo 7. O indivíduo IV-2 é o probando. Mãe (III-1) e avó materna (II-1) apresentam um alelo mutado, bem como o indivíduo II-4. Outros indivíduos apresentam sintomas da doença e estão em investigação.

5.2. Avaliação Genética

5.2.1. Cariótipo

Os cariótipos de vinte e sete participantes do estudo foram realizados e analisados no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Departamento de Genética do ICB1, da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os resultados de todos os cariótipos mostraram-se normais, conforme exemplo da Figura 8.

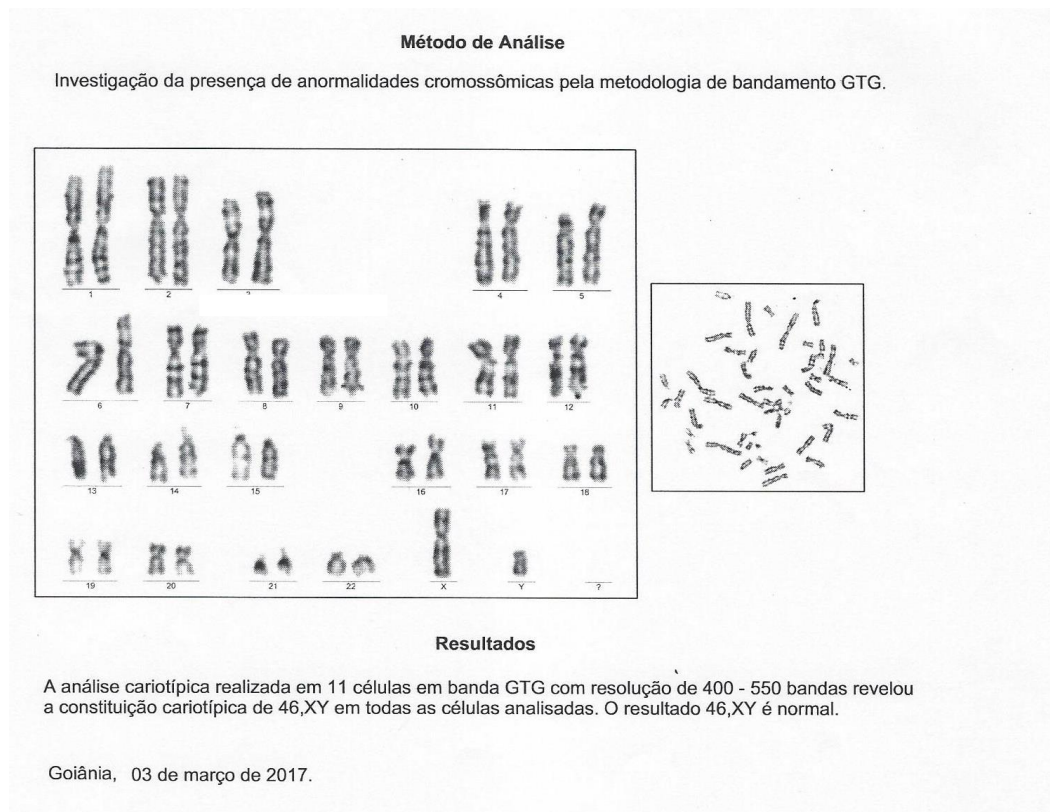


Figura 8 – Laudo do cariótipo de um dos pacientes do estudo.

5.2.2. Análise das Regiões Subteloméricas (MLPA)

A análise por MLPA das regiões subteloméricas foi realizada em amostras de sangue de todos os participantes do estudo e não foram detectadas. A Figura 9 representa o resultado normal de um dos pacientes avaliados e a Figura 10 demonstra como seria o resultado de um exame alterado, neste exemplo, uma MLPA que detectou microdeleção na região 3p.

Figura 9 - Representação da MLPA com resultado normal de um dos pacientes do estudo (Kit SALSA MLPA P036 e software Coffalyser).

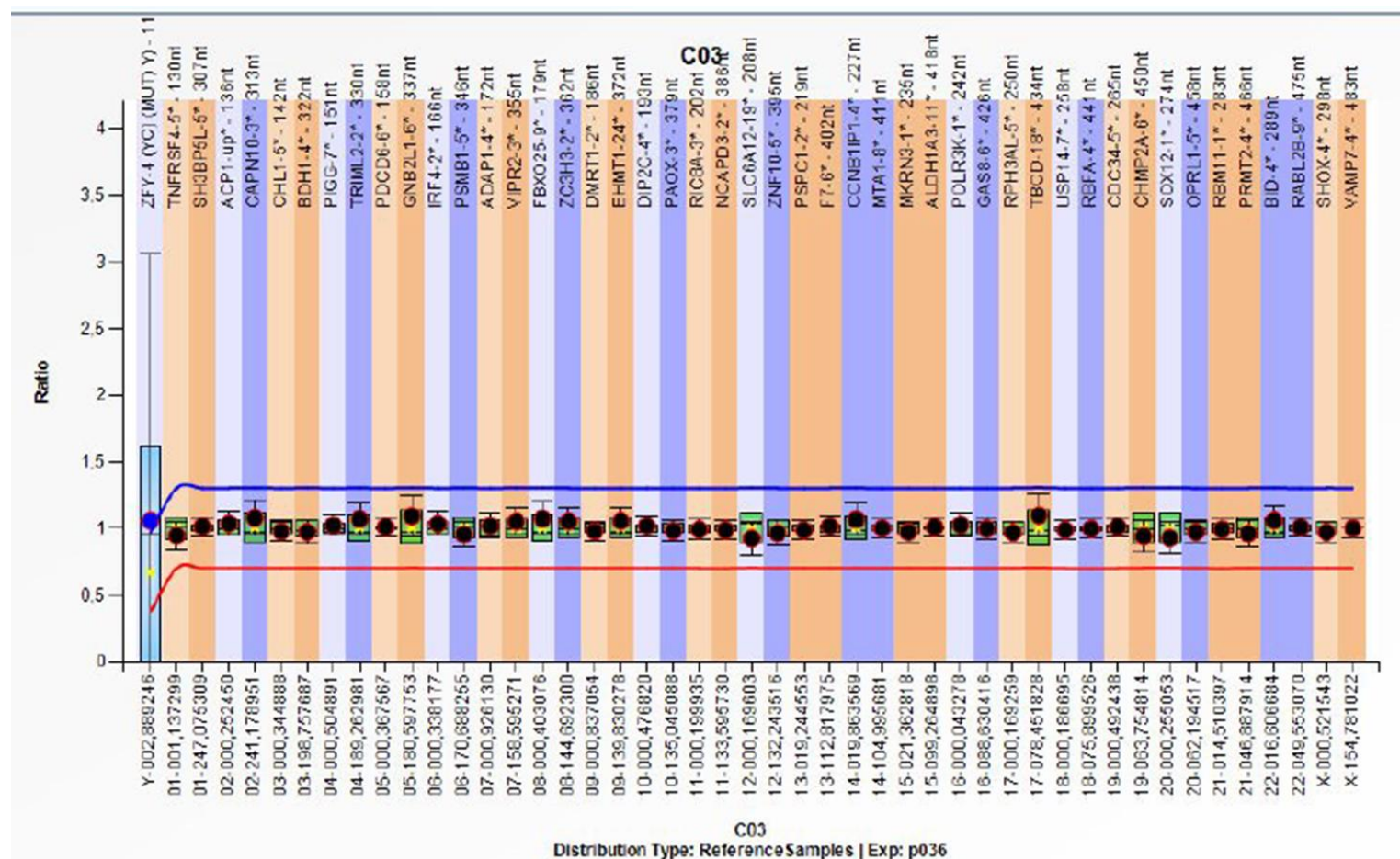
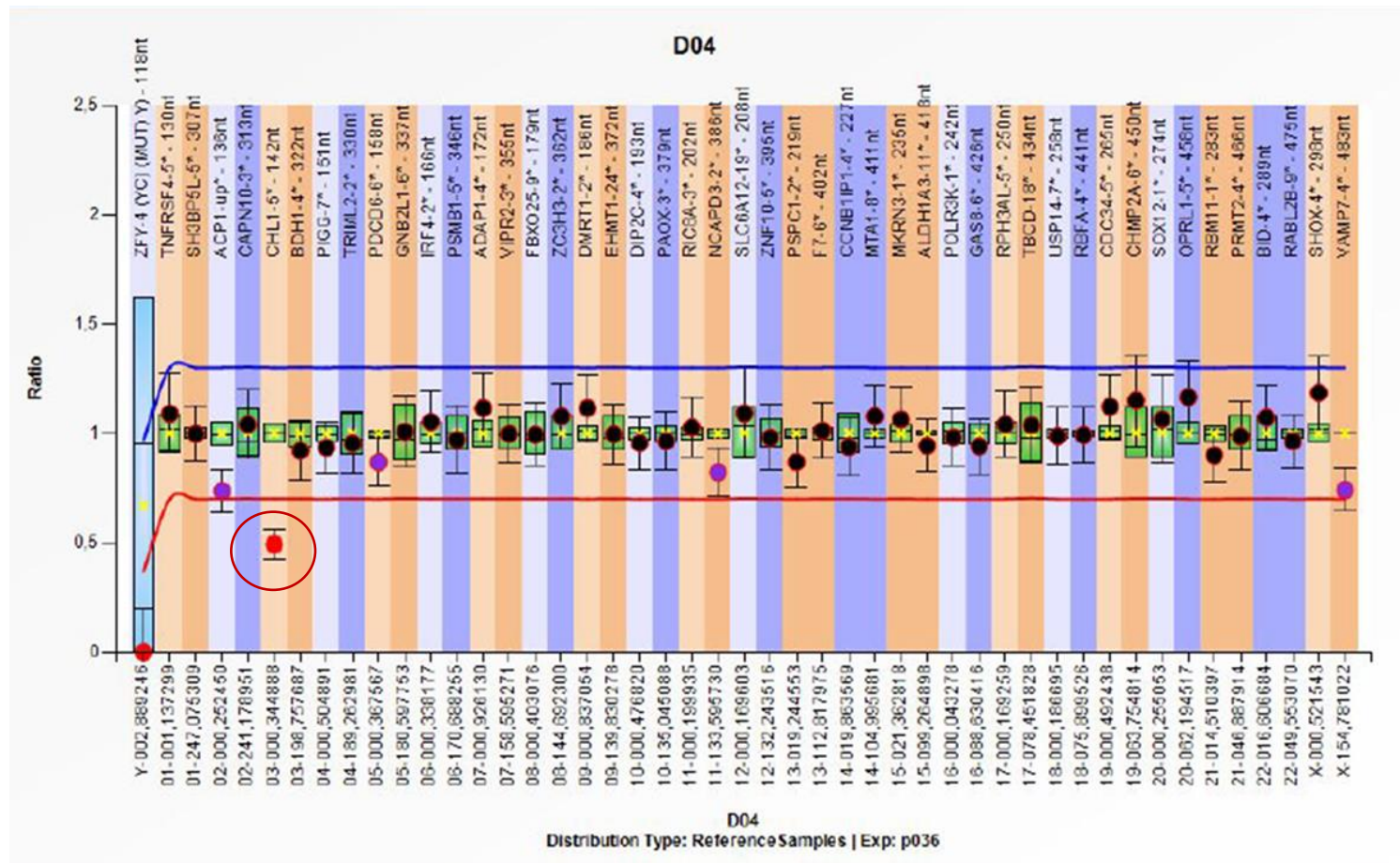


Figura 10 – Representação de uma MLPA hipotética detectando uma deleção na região 3p (Kit SALSA MLPA P036 e software Coffalyser).



5.2.3. Pesquisa da Síndrome do X-Frágil (PCR)

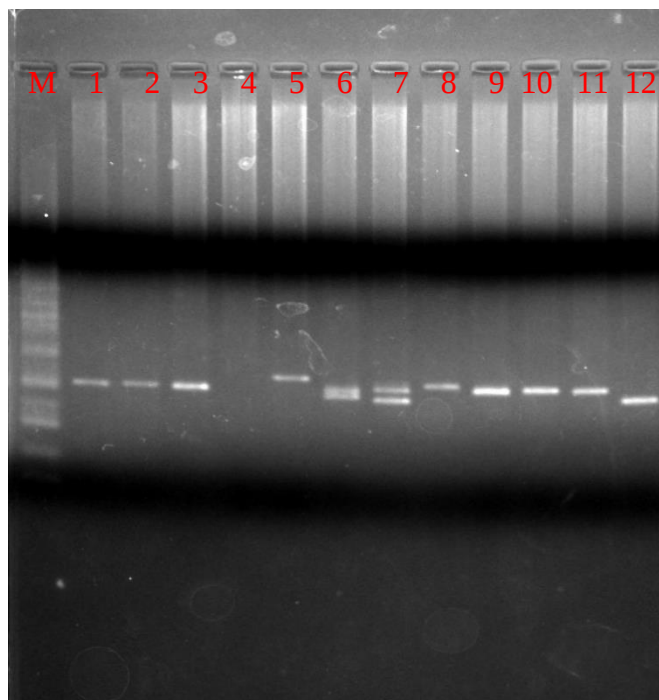
A pesquisa da Síndrome do X-Frágil foi realizada em 12 pacientes da nossa amostra, por meio de reações de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação da região CGG do gene *FMR1*. O exame foi realizado em cinco pacientes do sexo feminino e sete do sexo masculino. A avaliação foi positiva em um paciente do sexo masculino, este com idade de 10 anos e cuja mãe apresentava Deficiência Intelectual e que não se encontrava disponível para avaliação clínica e laboratorial. A mãe não teve enfermidades na gestação e não fez uso de drogas teratogênicas. O paciente nasceu a termo (37 semanas) e não teve intercorrências na maternidade. As manifestações clínicas deste adolescente foram a Deficiência Intelectual grave, pés planos, hipotonia muscular, flacidez articular e dismorfismos faciais (face grosseira e alongada; fronte e mandíbula proeminentes). Os exames laboratoriais usuais deste indivíduo foram normais, a tomografia de crânio revelou uma discreta dilatação ventricular sem transudação líquórica e a USG de abdome evidenciou uma colelitíase. O cariótipo e o MLPA tiveram resultados normais.

Os outros seis pacientes do sexo masculino, que fizeram a pesquisa da SXF, obtiveram resultados normais. Entre as cinco mulheres que realizaram a triagem para a SXF, duas tiveram resultados normais e três resultados inconclusivos (uma banda luminescente na eletroforese em gel de agarose).

5.2.4. Análise Cromossômica por Microarranjos

A metodologia de análise cromossômica por microarranjos foi realizada em 23 dos 27 indivíduos do estudo. Entre os pacientes que não fizeram a análise: dois tiveram a amostra de sangue degradada e não foi possível nova coleta; um paciente apresentou quadro sugestivo de AEC Tipo 7; o outro caso teve diagnóstico clínico de SXF e, contrariando o nosso protocolo, foi direto para a realização de exame específico para a doença, o qual confirmou o diagnóstico. O exame foi considerado sem CNVs patogênicas em dezesseis casos e com CNVs patogênicas em sete casos. A seguir, segue as descrições dos casos e seus respectivos rearranjos cromossômicos.

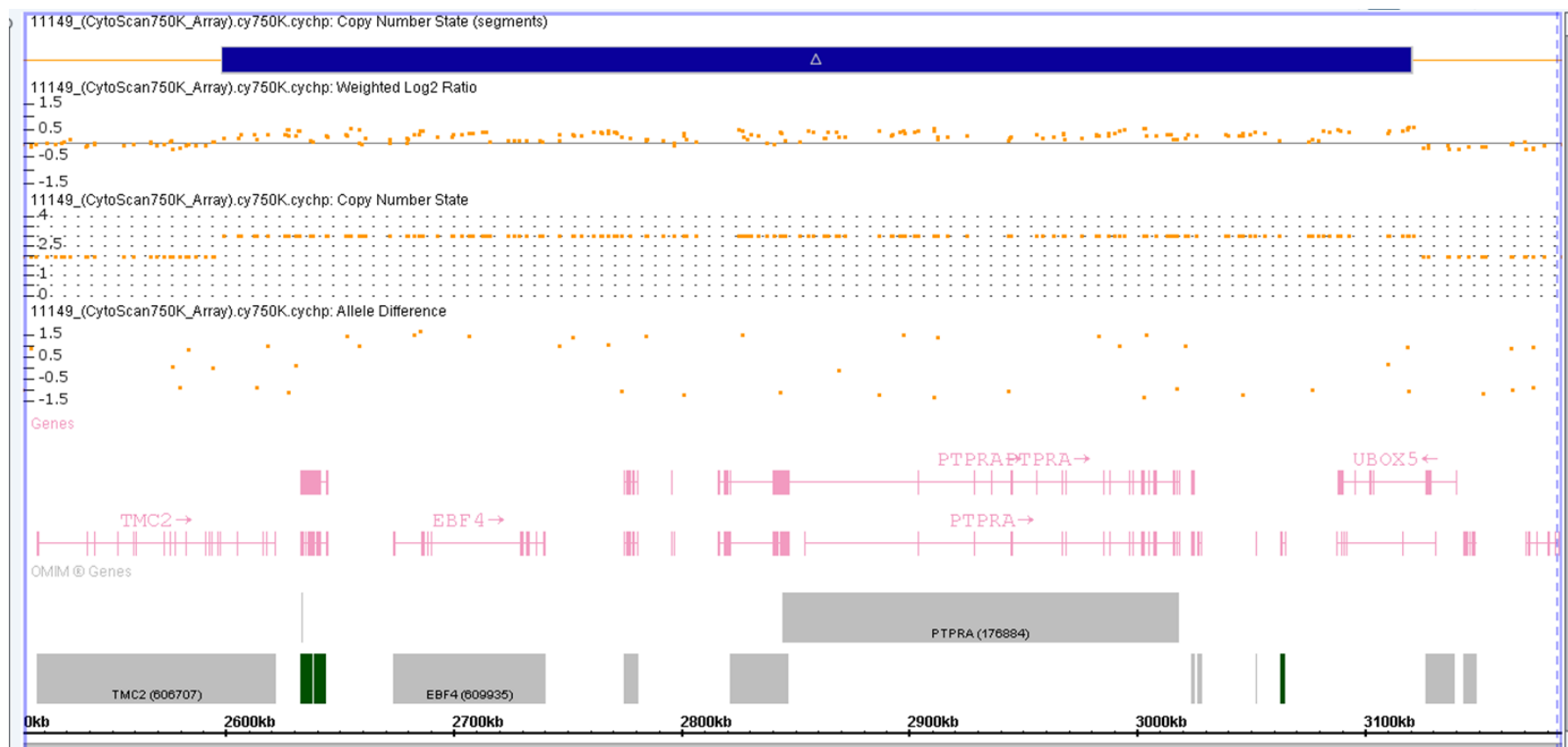
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação da região CGG do gene *FMR1* de 12 pacientes da amostra. M é o marcador da reação, a canaleta quatro é o caso do sexo masculino com resultado positivo 9sem amplificação) e as colunas 3, 9 e 10 são os indivíduos do sexo feminino com resultado inconclusivo (uma banda apenas).



5.2.4.1. Paciente 1

A análise cromossômica por microarranjos revelou uma microduplicação intersticial de aproximadamente 522kb em 20p13. A CNV se estendeu da posição 2.598.710 à 3.121.016 (Genome browser UCSC; construção hg19) e englobou os genes *TMC2* (OMIM 606707), *NOP56* (OMIM 614154), *MIR1292* (OMIM 614155), *IDH3B* (OMIM 604526), *EBF4* (OMIM 609935), *CPXM1* (OMIM 609555), *VPS16* (OMIM 608550), *PTPRA* (OMIM 176884), *GNRH2* (OMIM 602352), *MRPS26* (OMIM 611988), *OXT* (OMIM 167050) e *AVP* (OMIM 192340) (Figura 12).

Figura 12 – Resultado da análise cromossômica por microarranjos da paciente com microduplicação na região 20p13.



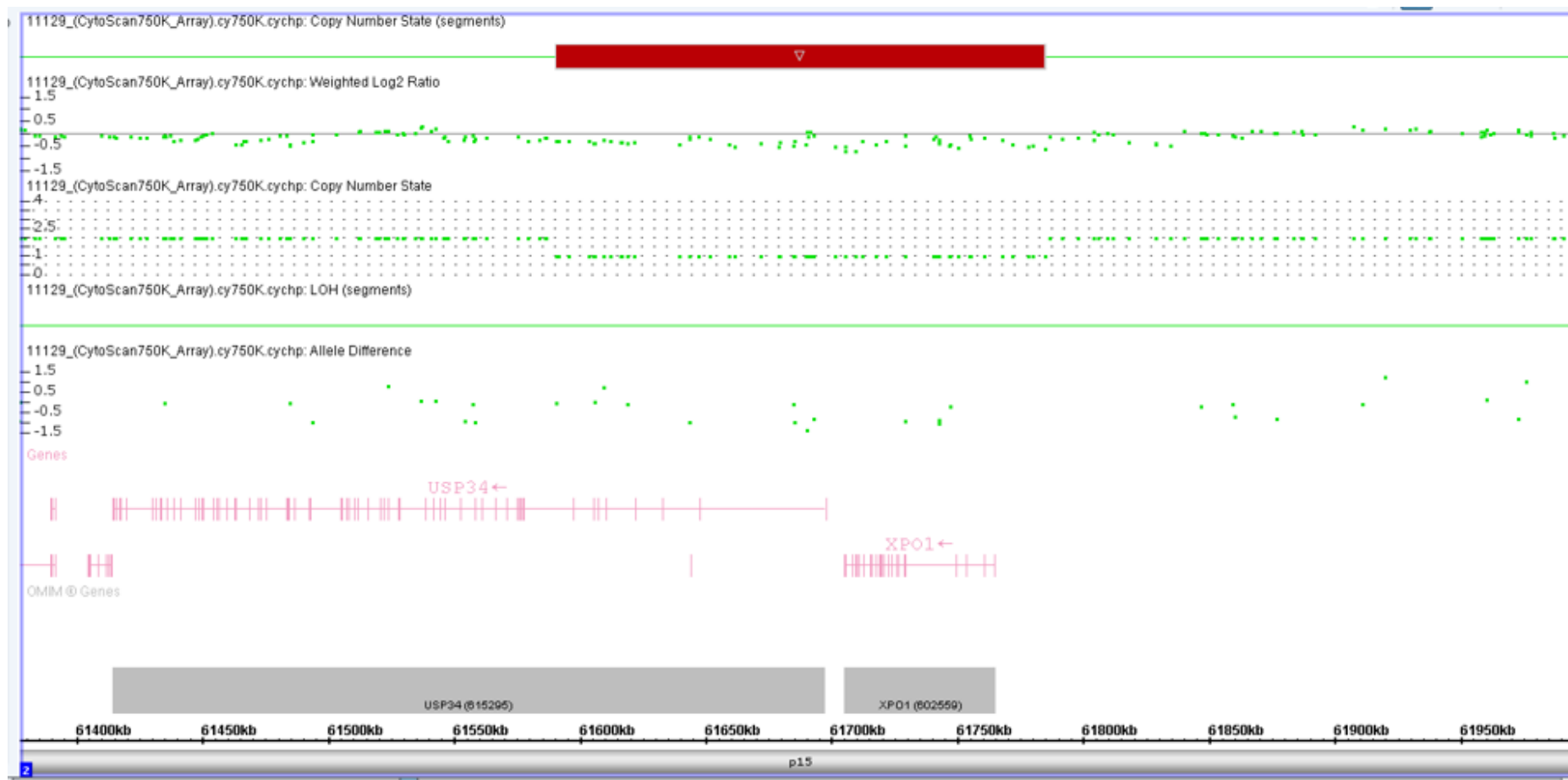
A paciente é filha única de pais não consanguíneos. Ela foi avaliada aos 22 anos de idade e sua mãe também apresentava Deficiência Intelectual. Durante a gestação, a mãe não utilizou álcool e drogas ilícitas, não apresentou evidências de doenças que pudessem levar a infecções congênitas, porém, a gravidez foi fruto de abuso de incapaz. A paciente nasceu de parto cirúrgico a termo. O peso ao nascer, comprimento ao nascer e o APGAR não estavam disponíveis. O neonato permaneceu dois dias na maternidade e nega intercorrências neste período. A paciente não exibia dismorfismos faciais e de membros, porém, apresentava baixa estatura. Ao que se refere às desordens do neurodesenvolvimento, esta demonstrava Deficiência Intelectual grave, Transtorno de Espectro Autista nível 3 e Epilepsia.

5.2.4.2. Paciente 2

A análise cromossômica com microarranjos revelou uma microdeleção com tamanho aproximado de 194kb e localizada na região 2p15. Este defeito cromossômico se estendeu da posição 61.590.611 a 61.784.752 e afetou parcialmente *XPO1* (*exportin 1*, *Genome browser UCSC*; construção *hg19*; coordenadas genômicas chr2: 61,705,069-61,764,245, OMIM 602559). A Figura 13 representa o resultado da análise cromossômica por microarranjos deste paciente (CytoScan HD Array - Affymetrix, EUA).

O paciente com a CNV é o segundo filho de uma prole de dois. Ele foi avaliado aos 16 anos de idade e a história familiar revelou um irmão mais velho com Deficiência Intelectual. Não foram encontrados dados sobre a sua gestação e nasceu de parto natural a termo sem intercorrências. Em relação ao seu nascimento, o peso foi de 3045g, o comprimento de 48cm, o perímetro cefálico de 35c, o APGAR 10 (5 minutos) e não teve intercorrências no período neonatal.

Figura 13 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos do paciente com deleção na região 2p15.



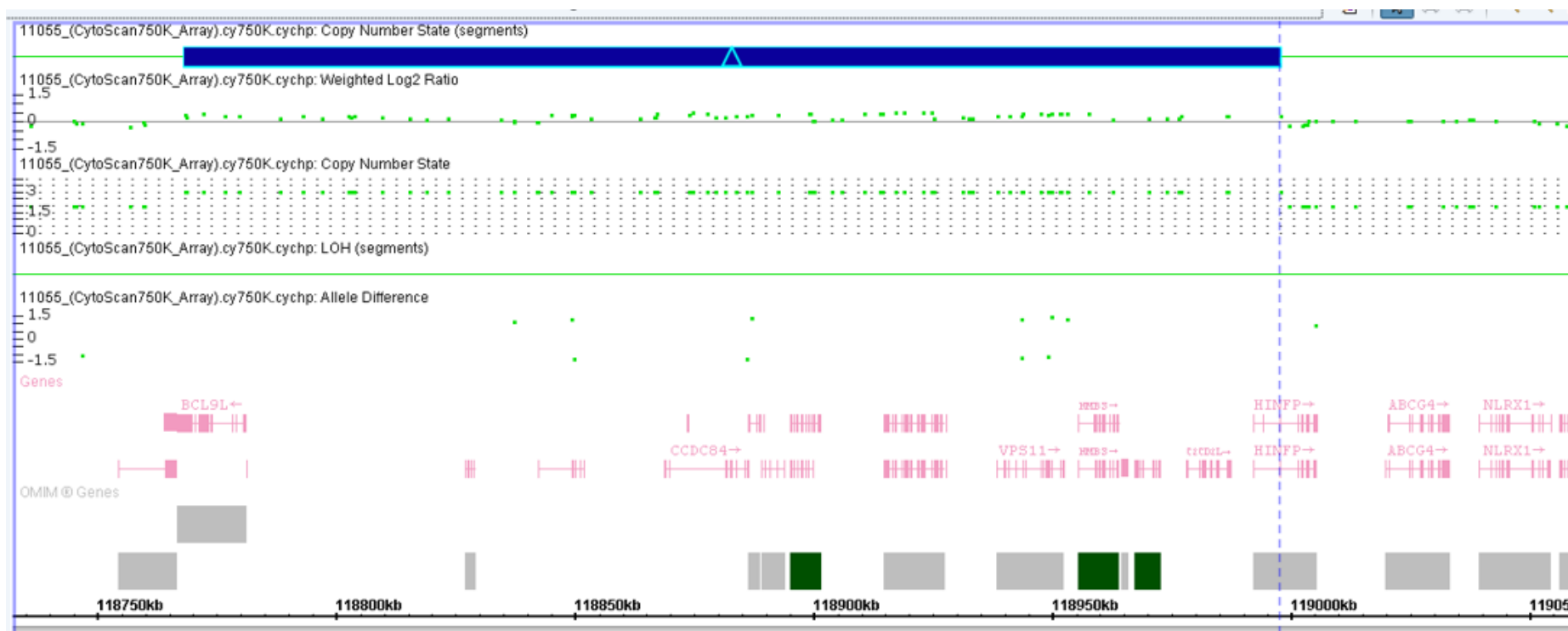
A sua avaliação clínica demonstrou uma Deficiência Intelectual profunda, paralisia flácida de membros inferiores (hipotonia), Deficiência Auditiva, Epilepsia, pés tortos congênitos e dismorfismos faciais (boca grande, base nasal larga, palato ogival, entre outros). Os exames laboratoriais usuais tiveram resultados normais. Exames de ultrassonografia abdominal, radiografia de tórax e tomografia computadorizada do encéfalo estavam dentro da normalidade. O seu eletroencefalograma exibiu atividade irritativa difusa e intensa atividade epileptiforme multifocal com predomínio do hemisfério direito. Quadro sugestivo da Síndrome de Lennox-Gastaut.

5.2.4.3. Paciente 7

A análise cromossômica por microarranjos revelou uma duplicação intersticial de aproximadamente 192kb na faixa de 3q29, se estendendo da posição 197.451.713 a 197.643.460. A CNV englobou o gene *BDH1* em sua totalidade (*3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1*, Genome browser UCSC; construção hg19; coordenadas genômicas chr3: 197.236.654-197.282.858, OMIM 603063) (Figura 14). O indivíduo em questão também apresentava uma microduplicação na região 11q23.3, compreendendo da posição 118.768.268 a 118.997.828. Esta CNV afetou os genes *BCL9L* (OMIM 609004), *UPK2* (OMIM 611558), *RPS25* (OMIM 180465), *TRAPPC4* (OMIM 610971), *SLC37A4* (OMIM 602671), *HYOU1* (OMIM 601746), *VPS11* (OMIM 608549), *HMBS* (OMIM 609806), *H2AFX* (OMIM 601772) e *DPAGT1* (OMIM 191350) e *HINFP* (OMIM 607099).

O indivíduo com a mutação é o segundo filho de pais não consanguíneos. Ele foi avaliado aos 10 anos de idade e a história familiar não revelou parentes com Deficiência Intelectual. Durante a gestação, a mãe não utilizou álcool e drogas ilícitas, porém, teve episódios de ITU. O paciente nasceu de parto natural a termo sem intercorrências e evoluiu com icterícia neonatal discreta. O seu peso ao nascer foi de 2920g, o comprimento ao nascer 49 cm e APGAR 9/10 (um e cinco minutos).

Figura 14 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos do paciente com microduplicação da região 3q29.



A criança apresentava microcefalia, face alongada, palato ogival, base nasal ampla e baixa implantação das orelhas. A paciente também exibia Deficiência Intelectual grave, Paralisia Cerebral tetraplégica espástica, Epilepsia, atrofia muscular proeminente e criptorquidia. Os exames laboratoriais usuais tiveram resultados normais. Exames de ultrassonografia abdominal e radiografia de tórax estavam dentro da normalidade. A tomografia computadorizada (TC) do encéfalo apresentou resultado sugestivo de paquigiria e agenesia de septo pelúcido.

5.2.4.4. Paciente 11

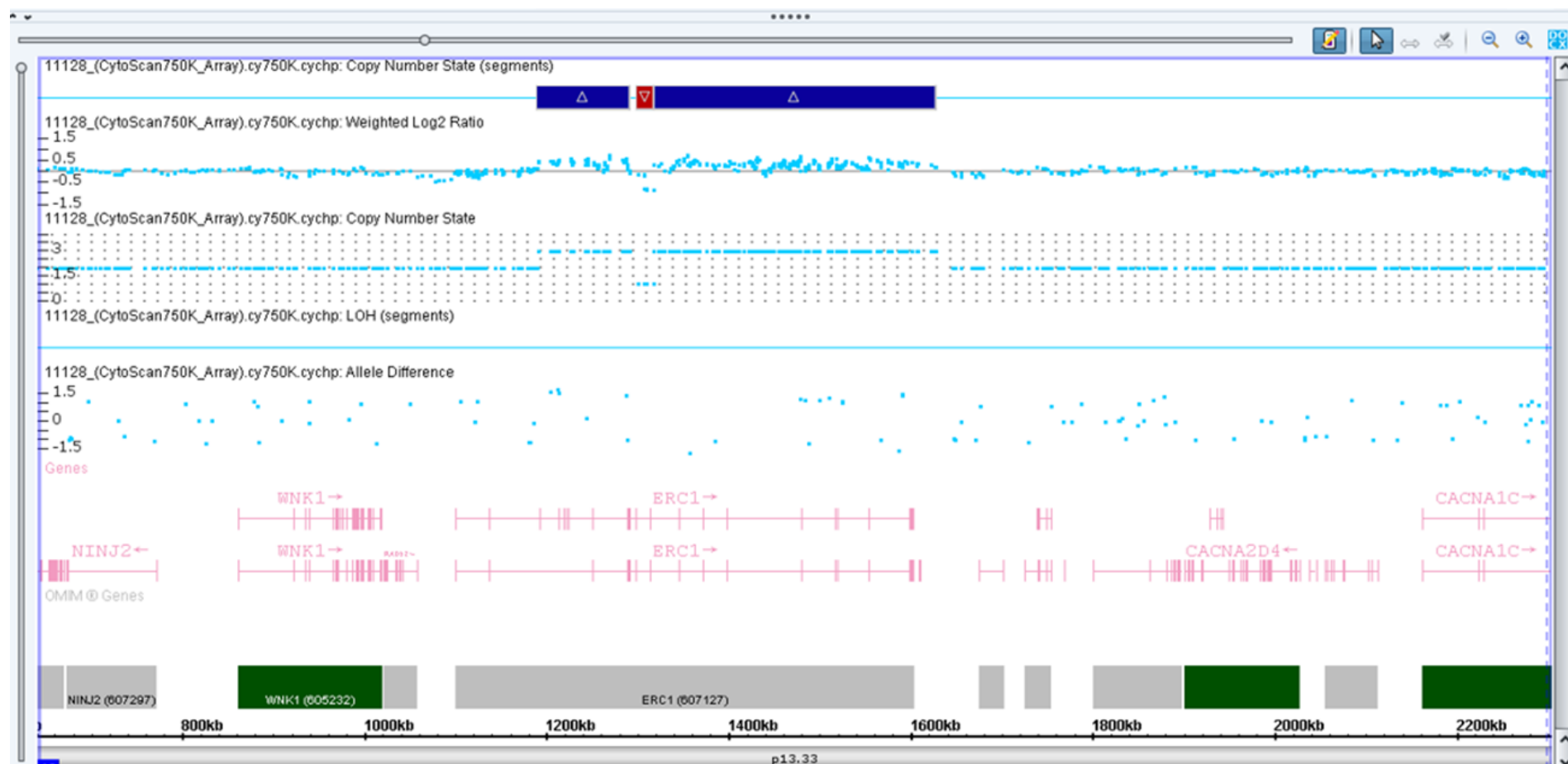
A análise cromossômica por microarranjos revelou um rearranjo cromossômico complexo de aproximadamente 438kb na faixa de 12p13.33, que se estendeu da posição 1.190.349 a 1.627.395. As CNVs consistiam de duas áreas de microduplicações e uma área central de microdeleção (Figura 15 e Tabela 5), de forma que, as primeiras margeavam a segunda. As alterações cromossômicas afetaram parcialmente o *ERC1* (interacting/cast family, member 1) (Genome browser UCSC - construção hg19; OMIM 607127).

Tabela 5 - Descrição do rearranjo cromossômico complexo em 12p13.33 (tamanho, pontos de quebra distal e proximal).

CNVs	Tamanho pb	Ponto de quebra distal	Ponto de quebra proximal
Duplicação 12p13.33	309757	1.317.638	1.627.395
Deleção 12p13.33	26559	1.291.079	1.317.638
Duplicação 12p13.33	100730	1.190.349	1.291.079

A paciente com o rearranjo é a terceira filha de pais consanguíneos. Ela foi avaliada aos 22 anos de idade e a história familiar revelou várias pessoas com Deficiência Intelectual e sua mãe apresentava Deficiência Auditiva. Na gestação, sua mãe não utilizou álcool e drogas ilícitas, assim como, não apresentou evidências de doenças que pudessem levar a infecções congênitas.

Figura 15 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos demonstrando um rearranjo cromossômico complexo de aproximadamente 438kb na região 12p13.33.



A paciente nasceu de parto natural a termo. O seu peso ao nascer foi de 2600g, o comprimento ao nascer não estava disponível e APGAR não estava disponível. O neonato permaneceu dois dias na maternidade e teve alta sem intercorrências.

Em relação aos distúrbios faciais, a jovem apresentava braquicefalia, limítrofe para microcefalia, face retangular grosseira, fronte proeminente, implantação baixa das orelhas, lábio superior fino, dentes malformados e palato ogival. A paciente também exibia Deficiência Intelectual profunda, Paralisia Cerebral tetraplégica espástica, Deficiência Visual e Auditiva, Epilepsia, escoliose torácica grave, atrofia muscular proeminente e malformações dos pés e pododáctilos.

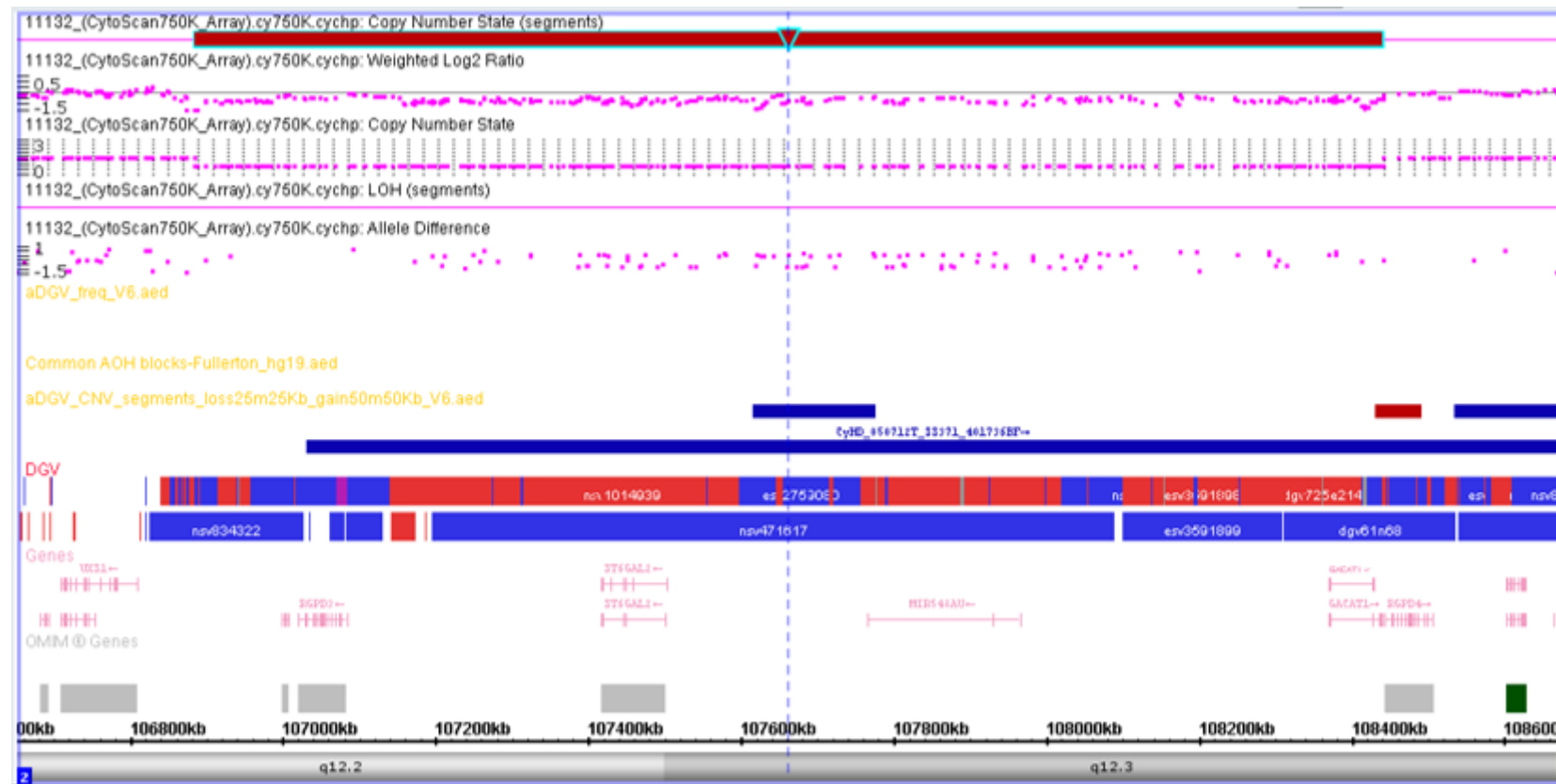
Os exames laboratoriais usuais tiveram resultados normais. Exames de ultrassonografia abdominal e radiografia de tórax também estavam dentro da normalidade. A tomografia computadorizada (TC) do encéfalo demonstrou desproporção craniofacial, com sinal de redução volumétrica encefálica de forma exacerbada para a faixa etária (atrofia cerebral).

5.2.4.5. Paciente 16

A análise cromossômica por microarranjos evidenciou uma deleção de aproximadamente 1,55 Mb na região 2q12.2q12.3, se estendendo da posição 106.884.820 a 108.440.138 (Genome browser UCSC; construção hg19). Entre estas posições encontramos os genes *PLGLA* (OMIM 612212), *RGPD3* (OMIM 612706) e *ST6GAL2* (OMIM 608472) (Figura 16).

A adolescente com o defeito cromossômico é filha única. Ela foi avaliada aos 10 anos de idade e apresentava histórico de maus tratos por parte de seus genitores. Na gestação, sua mãe utilizou álcool e tabaco, porém, esta nega uso de drogas ilícitas. A genitora foi espancada durante a gravidez pelo seu esposo, que a atingia com frequência no abdome. A paciente nasceu de parto cirúrgico pós-termo sem intercorrências. O seu peso ao nascer foi de 2950g, o comprimento ao nascer de 47cm e o APGAR não estava disponível.

Figura 16 - Resultado da análise cromossômica por microarranjos demonstrando uma deleção de aproximadamente 1,55 Mb na região 2q12.2q12.3.

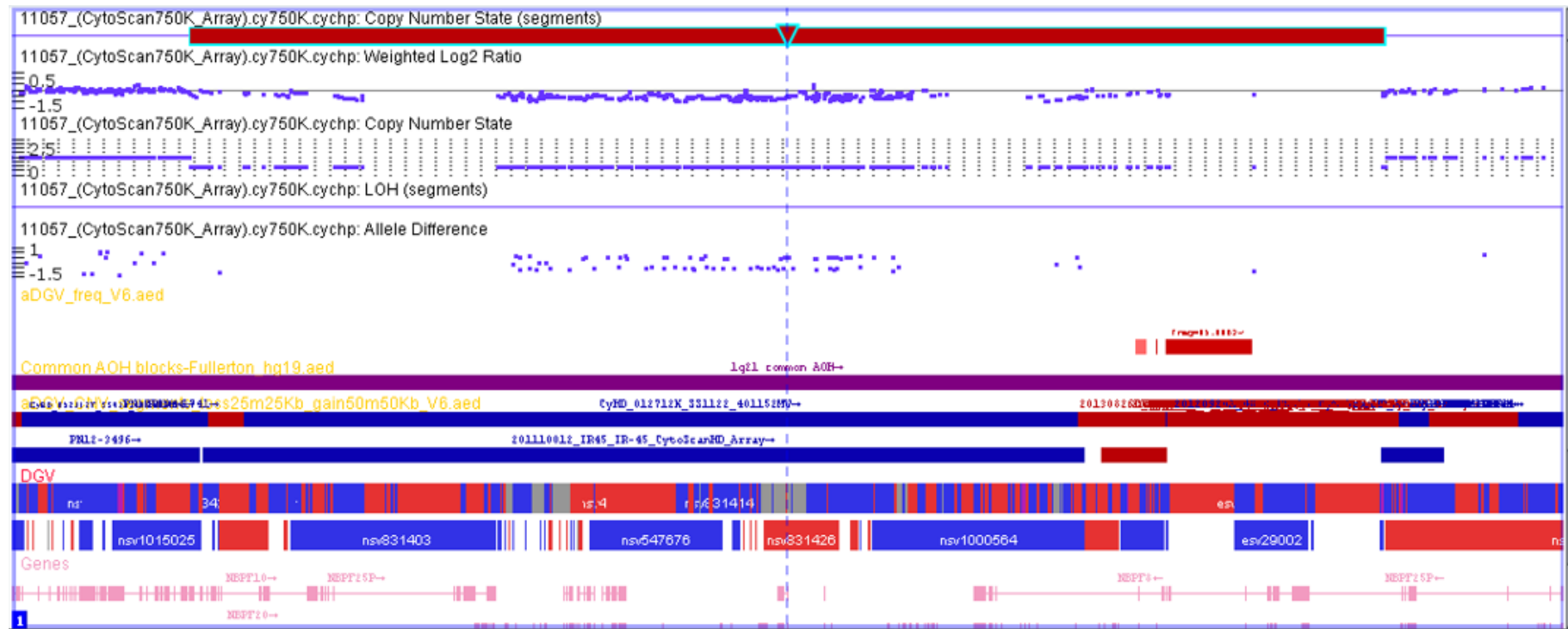


A paciente nasceu com um Distúrbio de Fechamento do Tubo Neural (DFTN), que consistia de uma mielomeningocele toracolombar e, por este motivo, teve que ser transferida para um hospital terciário. Neste estabelecimento, a malformação foi cirurgicamente corrigida e sucedida de numerosas complicações respiratórias e infecciosas, que a obrigaram a ficar internada por dois meses.

A adolescente não apresentava dismorfismos faciais, porém, demonstrava microcefalia, baixa estatura, baixo peso, malformações ósseas (fusão de arcos costais e peito escavado) e renais (rim esquerdo atrófico, hipofuncionante e aderido ao rim direito). Em seu exame clínico foi evidenciada Deficiência Intelectual grave, Deficiência Auditiva e Epilepsia. Em relação às sequelas da mielomeningocele, a paciente desenvolveu uma paralisia flácida/deformidade de membros inferiores e a bexiga neurogênica. Os exames laboratoriais usuais tiveram resultados normais. A tomografia de tórax evidenciou as alterações secundárias ao DFTN (coluna e medula) e a fusão dos arcos costais. A tomografia computadorizada do encéfalo demonstrou uma hidrocefalia supratentorial sem sinais de hipertensão e a agenesia de septo pelúcido. Outros procedimentos realizados foram a cintilografia renal e o estudo urodinâmico.

5.2.4.6. Paciente 17

A análise cromossômica por microarranjos evidenciou uma deleção de aproximadamente 2,75 Mb na região 1q21.1q21.2, se estendendo da posição 145.764.678 a 148.520.164 (Genome browser UCSC; construção hg19). Este rearranjo cromossômico afetou os genes *NBPF10* (OMIM 614000), *GPR89A* (OMIM 612821), *HYDIN2* (OMIM 610813), *NBPF12* (OMIM 608607), *PRKAB2* (OMIM 602741), *FMO5* (OMIM 603957), *CHD1L* (OMIM 613039), *BCL9* (OMIM 602597), *ACP6* (OMIM 611471), *GJA5* (OMIM 121013), *GJA8* (OMIM 600897), *GPR89B* (OMIM 612806), *NBPF11* (OMIM 614001), *NBPF8* (OMIM 613998) e *NBPF14* (OMIM 614003) (Figura 17).



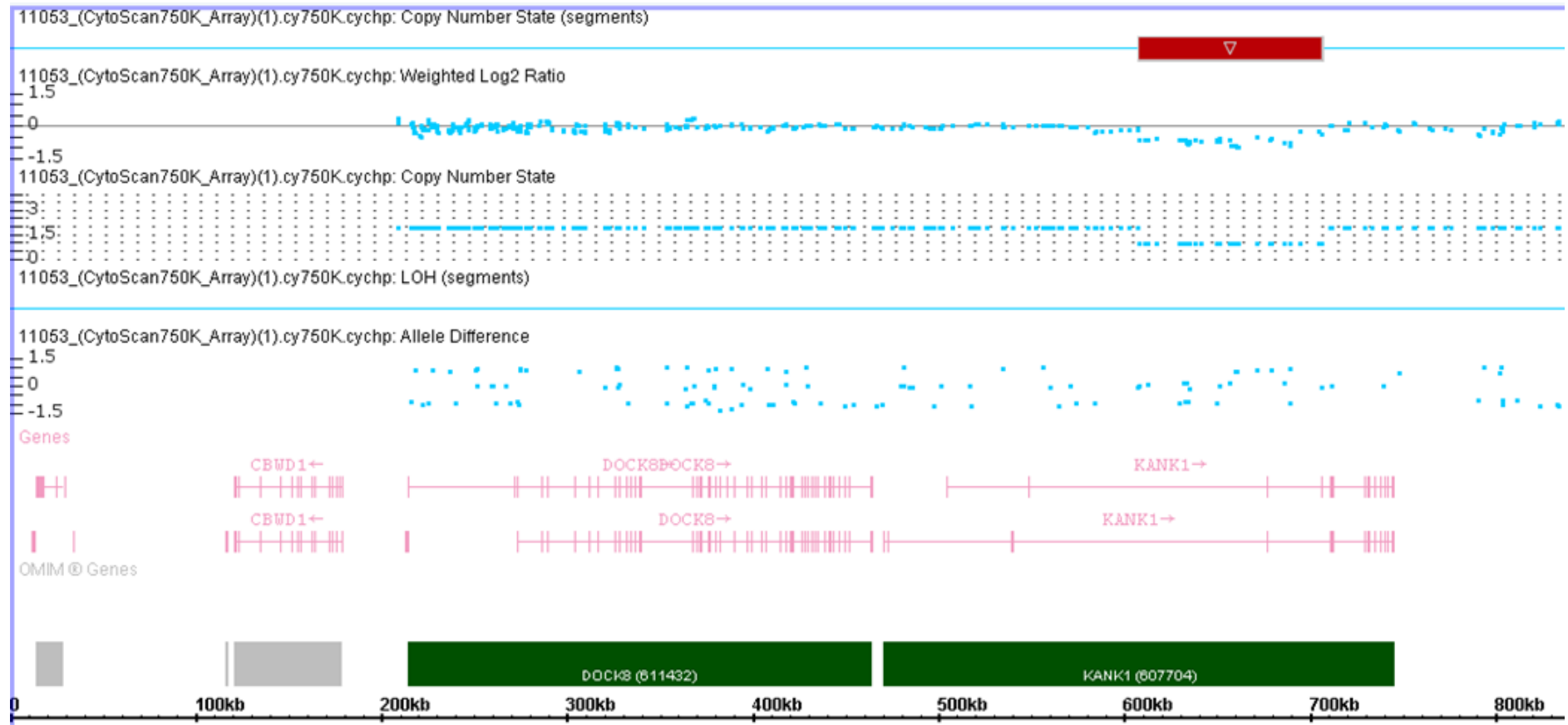
Avaliada aos 22 anos de idade, a paciente é a segunda filha de uma prole de dois, sendo que, sua irmã mais velha faleceu com 24 horas de vida de causa não esclarecida. A sua mãe negou uso de drogas lícitas e ilícitas na gestação. A genitora era portadora de distúrbio bipolar severo e cardiopatia, em função de complicações desta última culminou o seu óbito. A paciente nasceu de parto natural a termo em sua residência. Ao nascer, o neonato não chorou e apresentou cianose. Os dados antropométricos ao nascer e o APGAR não foram mensurados.

A paciente nasceu com mielomeningocele sacral e hidrocefalia, os quais foram corrigidos ainda no período neonatal. Como sequela, o DFTN desencadeou paralisia flácida/deformidade de membros inferiores e bexiga neurogênica. A paciente demonstrava dismorfismos faciais (boca larga, base nasal ampla, palato arqueado, olhos fundos e sobrancelhas grossas) e apresentava baixa estatura, obesidade, microcefalia, Deficiência Intelectual grave e Epilepsia. Os exames laboratoriais usuais tiveram resultados normais. A tomografia de abdome evidenciou mielomeningocele sacral com sinais de manipulação cirúrgica, defeito na fusão dos arcos sacrais posteriores, cistostomia, hipoplasia renal à direita, nefrolitíase bilateral, escoliose em S da coluna toraco-lombar e displasia acetabular à esquerda. A tomografia computadorizada do encéfalo diagnosticou uma hidrocefalia supratentorial, derivação ventrículo-peritônio em corno occipital do ventrículo lateral direito e imagens hipoatenuantes nos lobos frontais sugestivas de encefalomalácia.

5.2.4.7. Paciente 20

A análise cromossômica por microarranjos revelou uma deleção intersticial de aproximadamente 98kb na faixa de 9p24.3, que se estendeu da posição 607.900 a 706.265 (Genome browser UCSC; construção hg19) e englobou apenas o gene *KANK1* (*KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1*, OMIM 607704) (Figura 18).

Figura 18 – Resultado da análise cromossômica por microarranjos da paciente com deleção na região 9p24.3 (*KANK1*).



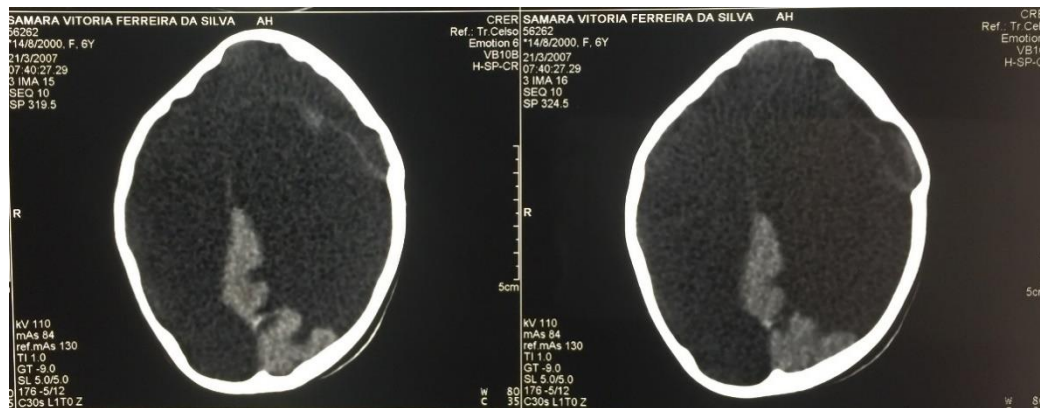
A adolescente com o rearranjo é a segunda filha de pais não consanguíneos. Ela foi avaliada aos 15 anos de idade e a história familiar revelou um tio com Deficiência Intelectual. Sua mãe morreu de complicações da SIDA adquirida após seu nascimento e os dados sobre seu pai não estavam disponíveis. Durante a gestação, a mãe não utilizou drogas lícitas/ilícitas e não apresentou evidências de doenças que pudessem levar a infecções congênitas.

Com 26 semanas e quatro dias de gestação, a paciente nasceu de parto natural pélvico prematuro. O seu peso ao nascer foi de 900g, o comprimento ao nascer não estava disponível e APGAR 2/4 (um e cinco minutos). Um dia antes de seu nascimento, uma ultrassonografia obstétrica de sua mãe diagnosticou hidrocefalia fetal, mais proeminente no hemisfério esquerdo. O neonato permaneceu um longo tempo na UTI, onde apresentou numerosas intercorrências.

Em relação aos distúrbios faciais, a criança apresentava microcefalia, fronte proeminente, retrognatia e face grosseira. A paciente também exibia Deficiência Intelectual profunda, Paralisia Cerebral tetraplégica espástica, Deficiência Visual e Auditiva, Epilepsia, escoliose torácica grave e atrofia muscular proeminente.

Os exames laboratoriais usuais tiveram resultados normais. Exames de ultrassonografia abdominal e cardíaca estavam dentro da normalidade. A tomografia computadorizada (TC) do encéfalo mostrou espaço líquido cérebro-espinhal ocupando quase toda a cavidade supratentorial. Má formação de quase todo o cérebro, com pequenas áreas de preservação nas regiões occipitotemporal, parietal e parassagital no temporal esquerdo e direito (Figura 19).

Figura 19 – Imagens da tomografia de crânio da paciente com a deleção em 9p24.3 exibindo hidranencefalia.



6. DISCUSSÃO

A Deficiência Intelectual é uma condição que se origina na infância, uma fase crítica do desenvolvimento humano e é caracterizada por significativa limitação no domínio conceitual, social e prático. A DI apresenta alta incidência mundial e afeta em torno de um em cada mil habitantes do planeta. Em resposta ao tamanho e gravidade deste problema, o Brasil vem tentando desenvolver políticas públicas para o diagnóstico e tratamento das pessoas com DI, porém, ainda insuficientes para atender toda a população acometida (MAULIK et al, 2011; TASSÉ, LUCKASSON, NYGREN, 2013; APA, 2013; BRASIL, 2014).

6.1. Discussão dos Achados Clínicos

No presente estudo, um total de 48 pacientes com até 25 anos e que apresentava alguma forma de DI foram avaliados. Esta idade foi escolhida porque os pacientes mais velhos continham poucas informações nos seus prontuários. A ausência de dados relativos à gravidez, ao parto e às suas infâncias inviabilizaria a classificação da etiologia da DI nestes casos.

Após avaliação detalhada e exames complementares, 21 indivíduos foram excluídos do estudo (43,75%), uma vez que as DI descritas eram de etiologias já conhecidas ou faltavam dados para os estudos etiológicos. Vinte e sete casos com DI indeterminada (56,25%) foram mantidos e que se beneficiariam com a realização de exames genéticos. Na casuística do trabalho, o percentual de pacientes sem o diagnóstico etiológico da DI esteve de acordo com os valores encontrados em estudos anteriores e expressa a dificuldade em se achar a causa desta complexa manifestação clínica (MAULIK et al, 2011; LÓPEZ-PISON et al, 2014).

6.1.1. Características Sociodemográficas e Familiares

A casuística foi composta, em sua maioria, por adolescentes e adultos jovens, oriundos da região centro-oeste. Segundo o Censo Brasileiro de 2010, a

população brasileira é constituída por 48,97% de pessoas do sexo masculino e 51,03% do sexo feminino. Na amostra, não foi evidenciada diferença significativa entre homens (55,55%) e mulheres (44,45%), quando comparamos com a população brasileira, porém, houve um ligeiro predomínio do sexo masculino ($P = 0,4936$). Da mesma forma, os estudos prévios indicam um maior acometimento do sexo masculino, em uma proporção que pode chegar a 1,96 homens acometidos para cada mulher (Tabela 1) (LEONARD, WEN, 2002; HUANG et al, 2016).

Em 62,96% da série de casos, pelo menos um familiar foi acometido com a DI. Este percentual ficou ainda maior (73,91%), quando foram excluídos da contagem os indivíduos, dos quais não obtivemos informações sobre seus familiares. Este fato sugere que a DI foi transmitida através das gerações e, desta forma, possua um provável componente genético. As alterações cromossômicas e gênicas são causas prevalentes de DI e possuem padrão de herança familiar, principalmente, nos indivíduos com as formas brandas. A amostra deste estudo foi composta, em sua maioria, por pacientes com as formas graves de DI. Este elevado acometimento de suas parentelas foi um fato surpreendente e merece ser reavaliado em futuras pesquisas (Figura 4). (DES PORTES, LIVET, VALLÉE, 2002; ROPERS, 2010; COOPER et al, 2011; MEFFORD, BATSHAW, HOFFMAN, 2012).

6.1.2. Classificação da DI

Quase a totalidade da casuística apresentou DI síndrômica (26), as manifestações concomitantes mais comuns foram as deficiências físicas e sensoriais, as desordens do neurodesenvolvimento, a microcefalia, as malformações do SNC, as malformações cutâneas e faciais, e as malformações de ossos e membros. A classificação da DI em não síndrômica é uma tarefa difícil, visto que alguns sintomas relacionados com a DI podem passar despercebidos ou se manifestarem tardiamente. Na casuística do estudo, a DI como sintoma isolado foi algo incomum (KAUFMAN, AYUB, VINCENT, 2010).

A amostra foi composta por pacientes, principalmente, com as formas graves de DI. A institucionalização desses indivíduos ocorreu devido à extrema pobreza e problemas sociais graves, como o alcoolismo e drogadição de seus genitores, gravidezes em adolescentes, falhas nos programas de planejamento familiar, prostituição e violência sexual. A presença de casos mais graves era um fato previsto, visto que quanto maior a gravidade da DI, maiores as dificuldades de se cuidar destes indivíduos e, conseqüentemente, maior necessidade de internação em instituições especializadas (Tabela 2) (SCHALOCK, BORTHWICK-DUFFY, BRADLEY, 2010).

6.1.3. Avaliação Antropométrica

Por meio da avaliação antropométrica dos participantes, foi evidenciado que a DI teve um grande impacto, tanto na altura quanto no estado nutricional desses indivíduos. Em torno de 50% apresentavam baixa estatura, baixo peso e IMC abaixo do esperado. A microcefalia foi constatada em, aproximadamente, 50% da casuística estudada, dados que estão em concordância com Coronado e colaboradores (2015), que evidenciaram em 75% dos portadores de microcefalia a Deficiência Intelectual.

6.1.4. Comorbidades na DI Sindrômica

O número de casos com deficiências múltiplas observados foi elevado (66,67%) e englobou diferentes formas da Deficiência Física, a Deficiência Auditiva e a Deficiência Visual. A amostra foi constituída, em sua maioria, de pacientes com DI grave/profunda, fato que pode explicar a alta incidência encontrada de deficiências múltiplas (MUÑOZ-QUEZADA, LUCERO-MONDACA, 2011; MUÑOZ-QUEZADA, LUCERO-MONDACA, 2017).

Em relação às desordens do neurodesenvolvimento, foi encontrado em 18,52% dos participantes o TEA, esta coexistência já foi demonstrada pelos estudos anteriores, que detectaram a DI em até 75% dos autistas (MATSON, SHOEMAKER, 2009).

A Epilepsia esteve presente em mais da metade dos pacientes, principalmente, nas suas formas de difícil controle. Bowley e Kerr (2000), em uma revisão sistemática, evidenciaram a alta prevalência e o grande impacto que a Epilepsia exerce nas pessoas com DI. Os episódios convulsivos levam estes pacientes ao óbito e aumentam a necessidade de cuidados por parte de seus familiares e, por estes motivos, devem ser tratados com a maior eficácia possível.

Nos participantes da pesquisa, a quantidade, heterogeneidade e diversidade das malformações do SNC encontradas foi notável (Quadro 5) e, para cada uma delas, numerosos genes já foram implicados com sua etiologia. Detectada em um caso, a agenesia ou disgenesia de corpo caloso apresentou mais de 40 síndromes genéticas complexas implicadas com o seu aparecimento, originadas de vários tipos de mutações e localizadas em diferentes cromossomos (TORRES, SADDI, 2015).

Os dismorfismos cutâneos e faciais foram vistos em nove indivíduos da amostra, na maioria das vezes, estes foram inespecíficos e não conduziram a um diagnóstico sindrômico identificável. Esse fato ocorreu para as malformações em ossos, membros e órgãos, que não direcionaram para uma etiologia específica.

6.1.5. Associações entre a Gravidade da DI e as Demais Informações Pesquisadas

Nos pacientes da pesquisa, foi observada uma maior frequência do sexo feminino nos casos moderados da DI e do sexo masculino nos casos graves e profundos. Poucos artigos foram encontrados, que distribuíram a frequência do sexo dos pacientes com DI em função da gravidade. Um grande estudo australiano não encontrou diferenças nestas frequências e avaliou mais de 8000 indivíduos. Uma revisão sistemática evidenciou uma maior chance de indivíduos do sexo masculino desenvolverem DI após complicações no período neonatal, porém, não os distinguiu por nível de gravidade (BITTLES, PETTERSON, SULLIVAN, 2002; HUANG et al, 2016).

Os critérios de seleção dos pacientes para a internação na VSJBC podem ter influenciado nestes valores, porém, novos estudos epidemiológicos devem ser realizados, a fim de confirmar ou descartar a hipótese de que o sexo masculino apresenta formas mais graves de DI.

A distribuição dos casos com os índices antropométricos abaixo do esperado em função da gravidade da DI (BE e IMC baixo) demonstrou que, para a baixa estatura, havia uma tendência de aumento da sua frequência, conforme aumentava o nível de gravidade da DI. Já para o IMC, houve um aumento significativo da frequência em função do aumento do nível de gravidade da DI (Tabela 3). A obesidade esteve presente na maioria dos pacientes com DI moderada (60%), todos do sexo feminino e ausente naqueles com DI grave/profunda.

Ao avaliarem 614 institucionalizados na província de Buenos Aires, Bronberg e colaboradores (2011) demonstraram que, aqueles com DI grave/profunda apresentavam maior percentual de IMC abaixo do esperado e que nenhum daqueles com DI leve/moderada apresentava IMC abaixo do esperado. No mesmo estudo, detectaram que a obesidade era mais frequente em indivíduos do sexo feminino com DI leve/moderada (44%). Da mesma forma, três outros estudos chegaram à conclusão que o baixo peso pelo IMC e a obesidade são grandes problemas nos pacientes com DI. Estes resultados são semelhantes aos que foram encontrados na presente pesquisa (BHAUMIK et al, 2008; COSSIO-BOLAÑOS et al, 2015; HOEY et al, 2017).

Nos pacientes com DI grave/profunda, a desnutrição e a baixa estatura pode ser explicada pela presença de numerosas comorbidades, que levam à intercorrências clínicas com um profundo impacto sobre seus crescimentos e desenvolvimentos. Em um grande percentual de pacientes, a obesidade na DI moderada é resultado de uma alimentação de baixa qualidade e excessiva, como também, decorrente de distúrbios alimentares (TORRES, SADDI, 2015; HOEY et al, 2017).

A distribuição da microcefalia nos diferentes níveis de gravidade da DI não mostrou diferença significativa e não foram encontrados estudos que correlacionassem as duas variáveis (Tabela 4).

Em relação às deficiências múltiplas, a ocorrência da paralisia cerebral apresentou uma elevação estatisticamente significativa, em função do aumento da gravidade da DI. Não foi possível avaliar esta relação nas outras formas de deficiências físicas, que apresentaram uma frequência muito baixa para tal estudo (paralisia flácida de membros inferiores, ataxia e paralisia facial). Na Deficiência Auditiva e Visual foi detectada uma tendência de apresentar o mesmo comportamento que a Paralisia Cerebral (Tabela 4).

Na população chilena, cerca de 10% das pessoas com deficiência apresentaram múltiplas incapacidades. A presença de mais de uma deficiência atrasa o diagnóstico, dificulta a classificação de gravidade e complica o tratamento. As deficiências intelectuais, físicas e sensoriais interagem entre si e agravam umas as outras. Desta forma, a coexistência de várias deficiências pode ter agravado o quadro de DI instalado nos participantes dessa pesquisa (NOBRE et al, 1998; MUÑOZ-QUEZADA & LUCERO-MONDACA, 2011, 2017).

Os cinco indivíduos com TEA do estudo apresentaram a forma mais grave de autismo (Nível 3), porém, não foi detectada uma maior frequência destes casos nas formas mais graves da DI (Tabela 4). Os resultados estão em contradição com as pesquisas anteriores, as quais evidenciaram uma interação entre as duas, de forma que, a severidade do TEA aumenta a gravidade da DI e vice-versa (MATSON, SHOEMAKER, 2009; MEFFORD, BATSHAW, HOFFMAN, 2012).

Em relação à Epilepsia, quando foi comparada a ocorrência na DI moderada com a na DI profunda, a forma mais grave apresentou aumento no acometimento de 3,85 vezes (Tabela 4) ($P = 0,0315$). Em uma revisão sistemática, Robertson e colaboradores (2015) observaram que a frequência de Epilepsia nos pacientes aumentava conforme agravava a DI. Neste ponto, os dados deste trabalho estão em harmonia com a literatura (Tabela 4).

A presença ou ausência das malformações do SNC não se correlacionou com a gravidade da DI. Provavelmente, esta constatação ocorreu em decorrência da diversidade das alterações do SNC evidenciadas (TORRES, SADDI, 2015).

6.1.6. Caso Suspeito de Ataxia Espinocerebelar Tipo 7

O paciente 25 da nossa amostra apresentou o quadro clínico de Ataxia Espinocerebelar Tipo 7, apesar de sua mãe, avó e tio-avô já terem confirmado a doença por meio de PCR da região do gene ATXN7, o resultado do seu exame foi inconclusivo. Provavelmente, a mutação que carrega possui mais de 60 repetições e, desta forma, não diagnosticada pelos testes qualitativos. Até o presente momento, não conseguimos um local para realização do teste quantitativo da AEC7 deste caso.

6.2 Discussão dos Resultados dos Exames Genéticos

6.2.1. Cariótipo

Os cariótipos realizados não detectaram mutações numéricas ou estruturais nos pacientes do estudo, no entanto, os achados não foram discordantes dos estudos prévios. Este fato pode ser explicado pelo grupo amostral ter sido pequeno e não conter portadores da Síndrome de Down. Excluindo esta última, o cariótipo diagnostica menos de 4% das DI de etiologia genética. Considerando que a amostra analisada continha 27 indivíduos, a chance de positividade de um cariótipo foi de menos de 1,1%, ou seja, muito baixa (LEONARD, WEN, 2002; VAN KARNEBEEK et al, 2005a, 2005b; HOCHSTENBACH et al, 2011; ARTIGAS-PALLARÉS, GUITART, GABAU-VILA, 2013).

6.2.2. Análise das Regiões Subteloméricas (MLPA)

A análise das regiões subteloméricas pela técnica de MLPA foi realizada nos 27 indivíduos do estudo e não identificou alterações. Em séries de casos com DI indeterminada, o MLPA subtelomérico obteve taxas de diagnóstico entre 4,8 e 7%. Da mesma forma que para o cariótipo, a chance de detecção foi muito

baixa (aproximadamente 1,35%) e compatível com os resultados obtidos (AHN et al, 2007; 2008; ROOMS et al, 2011).

6.2.3. Pesquisa da Síndrome do X-Frágil (PCR)

O indivíduo 22 da nossa série de caso, ou seja, 3,7% da amostra apresentou a SXF. Os estudos anteriores sugerem que em torno de 2% dos pacientes com DI apresentem a doença, percentual não muito distante dos nossos resultados. A SXF é uma importante enfermidade no contexto da Deficiência Intelectual de etiologia genética e a presença de casos com a doença neste estudo era algo esperado (VAN KARNEBEECK et al, 2005a, 2005b).

6.2.4 Análise Cromossômica por Microarranjos

6.2.4.1. Paciente 1

Uma microduplicação intersticial na região 20p13 foi demonstrada neste caso. As CNVs desta região são pouco frequentes e, quando ocorrem, estão associados com outros defeitos cromossômicos. Frequentemente, as duplicações e deleções em 20p13 são de grande tamanho e englobam numerosos genes. Em função destas duas características, a correlação genótipo-fenótipo é dificultada e, desta forma, ainda não foi possível estabelecer regiões críticas e os genes responsáveis para o aparecimento dos sintomas (STARR et al, 2014; LEE, SHIN, 2017; KWON et al, 2018).

Nos poucos estudos encontrados, o quadro clínico associado com a deleção em 20p13 foi composto por características dismórficas variáveis e por desordens do neurodesenvolvimento (DI/AGD, TEA e atraso na fala). As manifestações clínicas da duplicação em 20p13 foram muito similares às aquelas encontradas nos casos de deleção. Em ambas CNVs, as DND estiveram presentes na grande maioria dos relatos (WERLING et al, 2014; KWON et al, 2018).

Na tentativa de aumentar a precisão da correlação genótipo-fenótipo, o banco de dados *Decipher* v9.25 foi vasculhado para defeitos cromossômicos na região 20p13. Os pacientes do banco de dados (n:149) apresentaram as mesmas características clínicas descritas nos estudos publicados. Ao se refinar a busca para as duplicações de tamanhos semelhantes ao presente relato e que afetaram as mesmas posições em 20p13, dois indivíduos foram encontrados. Ambos os casos apresentaram DI e em um destes foi descrita a baixa estatura, quadro clínico similar ao visto no atual estudo.

Na região 20p13, as posições compreendidas entre 2.598.710 e 3.121.016 albergam numerosos genes, os quais foram envolvidos com diversas doenças: *NOP56* e a Ataxia Espinocerebelar Tipo 36; *IDH3B* e a Retinite Pigmentosa; *PTPRA* e a Doença de Noonan, *ARVP* e a Diabetes Insipidus; *OXT* e o Autismo (OMIM, 2018; Genome Browser UCSC construção hg19, 2018).

O gene *OXT* codifica o neuropeptídeo ocitocina que, além de mediar o parto e a ejeção de leite, foi considerado um grande modulador de vários comportamentos sociais. Ao serem ativados, os receptores de ocitocina atuam no cérebro modulando a excitabilidade neuronal. Estudos em animais revelaram que, a deficiência deste neurotransmissor esteve associada aos distúrbios do neurodesenvolvimento. Nos indivíduos com a Síndrome de Prader-Willy foi observado um número menor de neurônios produtores de ocitocina, o que pode explicar o grande percentual de DI e TEA nestes pacientes. Desta forma, o gene *OXT* poderia ser responsável pelas alterações clínicas, que foram encontradas no paciente atual e nos de outros estudos (RAJAMANI et al, 2018).

6.2.4.2. Paciente 2

O participante da pesquisa apresentou uma deleção de 194kb localizada na região 2p15 e que acometeu parcialmente *XPO1*. Este gene é um receptor de exportação nuclear, que exporta aproximadamente 200 moléculas de carga do núcleo para o citoplasma (proteínas, rRNA, RNA nuclear pequeno [snRNA], miR, mRNAs específicos, entre outros) (RAJCAN-SEPAROVIC et al, 2007).

Os estudos anteriores descreveram a Síndrome da Microdeleção 2p15p16.1, cujos sintomas foram correlacionados com perda na CNVs em quatro genes críticos: *XPO1*, *USP34* (*Ubiquitin-specific protease 34*), *BCL11A* (*B-cell cl/lymphoma 11*) e *REL* (*Avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*). Os dois primeiros genes localizados em 2p15 e os últimos em 2p16.1, os quais desencadearam quadros clínicos muito semelhantes ao serem deletados (RAJCAN-SEPAROVIC et al, 2007; BAGHERI et al, 2016).

Em uma revisão sistemática, Bagheri e colaboradores (2016) catalogaram todos os 33 pacientes descritos com a Síndrome 2p15p16.1. Desde então, apenas oito novos relatos ocorreram e que exibiram quadro clínico semelhantes aos casos anteriores (LÉVI et al, 2017; SHIMBO et al, 2017; SOBLET et al, 2017). Neste estudo, o autor catalogou as manifestações clínicas da doença e calculou o percentual de indivíduos que as apresentaram. O Quadro 6 apresenta estes resultados, como também, a presença ou ausência dos sinais e sintomas no paciente da nossa amostra.

Quadro 6 - Manifestações clínicas da Síndrome da Microdeleção 2p15p16.1, como também, a presença ou ausência dos sinais e sintomas no paciente da amostra avaliada.

Manifestação clínica	% de casos	Paciente
DI/AGD	100	+
Microcefalia	79	-
Atraso na fala	76	+
Anomalias em dedos	76	+
Base nasal ampla	67	+
Pregas epicânticas	61	-
Telecanto	61	-
Ptose palpebral	54	+
Anormalidades cranianas	54	-
Hypotonia	54	+
Palato estreito e arqueado	51	+
Fissura palpebral descendente	51	+

Modificado de BAGHERI et al, 2016; DI: Deficiência Intelectual; AGD: Atraso Global no Desenvolvimento.

Desta forma, a análise cromossômica com microarranjos e a expressiva correlação clínica indicaram que o caso relatado apresentou uma Síndrome da Microdeleção 2p15p16.1 típica (LÉVI et al, 2017).

6.2.4.3. Paciente 7

Os exames moleculares deste indivíduo revelaram uma duplicação intersticial de aproximadamente 192kb na faixa de 3q29. Ao revisar a literatura, foram encontrados casos semelhantes, os quais foram denominados de Síndrome da Microdeleção e Microduplicação 3q29 (WILLATT et al, 2005; LISI et al, 2008).

A região 3q29 possui cinco genes conhecidos (TFRC, PAK2, ZDHHC9, DLG1 e BDH1) e 17 transcritos sem função definida, esta é flanqueada por duas sequências de repetição de baixo número de cópias com alta homologia (LCR). A maioria dos rearranjos em 3q29 possui pontos de quebra do DNA nestas LCRs e apresenta um tamanho típico de 1,6Mb. Este fato sugere que, as microdeleções/microduplicações ocorram durante a replicação e devido à recombinação homóloga não alélica. Desta forma, as microdeleções e as microduplicações seriam o produto recíproco uma da outra. Entretanto, o fato de algumas mutações encontradas ultrapassarem ou não atingirem as LCRs da região 3q29 põe em dúvida esta teoria, principalmente, se tratando do ganho de número de cópias (BALLIF et al, 2008).

Os pacientes com a Síndrome da Microdeleção 3q29 apresentam manifestações clínicas variáveis, as quais incluem a Deficiência Intelectual leve à moderada, a microcefalia, a ponte nasal elevada, o filtro curto, a ataxia, o TEA, as deformidades torácicas e os dedos longos. Os indivíduos com a Síndrome da Microduplicação 3q29 tendem a ter sintomas mais brandos, que incluem a Deficiência Intelectual leve à moderada (quase a totalidade dos casos), dismorfismos faciais, a microcefalia, ponte nasal elevada, a obesidade, os pés planos, o TEA, entre outros. Algumas manifestações clínicas foram observadas na minoria dos pacientes e estas incluem a fenda palatina, as malformações

cardíacas e oculares (WILLATT et al, 2005; GOOBIE et al, 2008; BALLIF et al, 2008).

Os primeiros relatos da Síndrome da Microduplicação 3q29 ocorreram em cinco pessoas de três gerações de uma família, os quais definiram as características clínicas da síndrome. O segundo relato avaliou 19 pacientes com a síndrome e constatou que, nos casos em que a avaliação genética dos pais foi possível, apenas 20% apresentavam mutações de novo e 80% as herdaram de pais portadores e saudáveis. Esta constatação pôs em dúvida a significância clínica da microduplicação 3q29 (LISI et al, 2008; BALLIF et al, 2008).

Quatro novos trabalhos sobre o assunto foram publicados desde então, onde todos os pacientes apresentaram rearranjos envolvendo *DLG1* (discs large, drosophila, homolog of, 1) e *BDH1* (3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1), os prováveis genes responsáveis pelo desencadeamento dos sintomas. *DLG1* e *BDH1* estão implicados com o desenvolvimento neuronal e com as sinapses, funções altamente relacionadas com os sintomas observados na síndrome. Entretanto, os genes *TFRC* (transferrin receptor), *PAK2* (protein-activated kinase 2) e *ZDHHC9* (zinc finger dhhc domain-containing protein 9) também possuem funções correlacionadas ao SNC ou foram associados a doenças neurológicas. O indivíduo do presente estudo apresentou uma duplicação relativamente pequena, porém que compreendia todo o gene *BDH1*, fato que explicaria as importantes manifestações clínicas por ele apresentadas (GOOBIE et al, 2008; ALEIXANDRE BLANQUER et al, 2011; FERNÁNDEZ-JAÉN et al, 2014; TASSANO et al, 2018).

Este foi o terceiro relato da Síndrome da Microduplicação 3q29 com sintomatologia grave, que incluiu a Deficiência Intelectual severa, microcefalia e Epilepsia. Afirmações contundentes sobre a relação genótipo-fenótipo para a síndrome não são possíveis, pois esta apresenta grau de penetrância divergente e alta variabilidade de expressão. Apesar da maioria dos pacientes com a microduplicação 3q29 terem exibido a DI/AGD, nenhum destes foi descrito com a paralisia cerebral tetraplégica espástica e este estudo foi o primeiro que relatou esta alteração motora. Espera-se, que relatos como este aumentem as informações sobre a doença, por meio da disponibilização de informações e de

material biológico para cooperação entre instituições (FERNÁNDEZ-JAÉN et al, 2014).

O indivíduo 7 da pesquisa também apresentou uma microduplicação na região 11q23.3. Este rearranjo cromossômico afetou diversos genes, porém, dois destes estão associados com doenças neurológicas. O gene *VPS11* (*Vacuolar Protein Sorting 11*) foi correlacionado com a Leucodistrofia Hipomielinizante Tipo 12 e o gene *DPAGT1* (*Dolichyl-Phosphate N-Acetylglucosamine Phosphotransferase*) foi associado com a Síndrome Miastênica Congênita Tipo 13 e com a Doença Congênita de Glicosilação Tipo 1j (OMIM, 2018). Ambos os genes se manifestam com caráter autossômico recessivo e, desta forma, seria improvável que um ganho de número de cópias desencadeasse estas doenças.

Ao se vasculhar o banco de dados *Decipher* v9.25 (2018), um paciente com duplicação muito semelhante ao do caso estudado apresentou Deficiência Intelectual, macrocefalia e obesidade (Genome Browser UCSC construção hg19, coordenadas genômicas chr11: 118.822.090 - 119.131.549). Em função dos elementos apresentados, o estudo funcional dos produtos gênicos envolvidos e o sequenciamento genômico desta região seria de grande auxílio na elucidação do papel dessa CNV no fenótipo do paciente do estudo.

6.2.4.4. Paciente 11

Uma mutação complexa foi detectada pelos exames moleculares deste indivíduo, localizada na região 12p13.33 e que afetou parcialmente o gene *ERC1* (OMIM 607127). Microdeleções e microduplicações envolvendo a região 12p13.33 são rearranjos cromossômicos muito raros e há poucos estudos sobre estes. Na revisão da literatura, menos de 20 pacientes foram relatados com essas CNVs e que demonstraram fenótipo variável (BAKER et al, 2002; MACDONALD et al, 2010; ABDELMOITY et al, 2011; MADRIGAL et al, 2012; VARGAS et al, 2012; THEVENON et al, 2013; FANIZZA et al, 2014; FARIA et al, 2016).

Os sinais e sintomas da microdeleção 12p13.33 foram leves e as características dismórficas detectadas foram: face grosseira; microcefalia; protusão frontal discreta; enoftalmia; epicanto; orelhas baixas com lóbulos auriculares antevertidos e grossos; filtro acentuado; narinas grandes; lábio superior fino; palato arqueado; dentes irregulares e estreitamente espaçados; sutura metópica proeminente; frouxidão articular moderada e unhas frágeis do primeiro dedo do pé. No Quadro 7 foram correlacionadas as características dismórficas associadas à microdeleção 12p13.33, com aquelas apresentadas pelo paciente deste estudo (BAKER et al, 2002; MACDONALD et al, 2010; ABDELMOITY et al, 2011; MADRIGAL et al, 2012; VARGAS et al, 2012; THEVENON et al, 2013).

Quadro 7 – Correlação entre as características dismórficas associadas à microdeleção 12p13.33 e as apresentadas pelo paciente deste estudo (THEVENON et al, 2013)

Características dismórficas da microdeleção 12p13.33 descritas em estudos prévios	Paciente
Face grosseira	+
Microcefalia	+
Fronte proeminente	+
Enoftalmia	-
Epicanto	-
Baixa implantação das orelhas, com lobos antevertidos e grossos	+
Filtro largo	+
Narinas largas	+
Lábio superior fino	+
Palato arqueado	+
Sutura metópica proeminente	+
Hipermobilidade de articulações moderada	-

Em relação aos transtornos do neurodesenvolvimento, os relatos anteriores de microdeleção 12p13.33 apresentaram a DI/AGD com atraso na fala acentuado e o Transtorno do Espectro do Autista. Outros diagnósticos foram o Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade, a ansiedade e as dificuldades

de aprendizagem (THEVENON et al, 2013; SILVA et al, 2014). O paciente avaliado apresentou atrofia cerebral e manifestações clínicas graves, como a Deficiência Intelectual profunda (DI), a Paralisia Cerebral quadriplégica espástica (PC), a Deficiência Sensorial e a Epilepsia, como também, uma escoliose torácica grave e uma atrofia muscular proeminente.

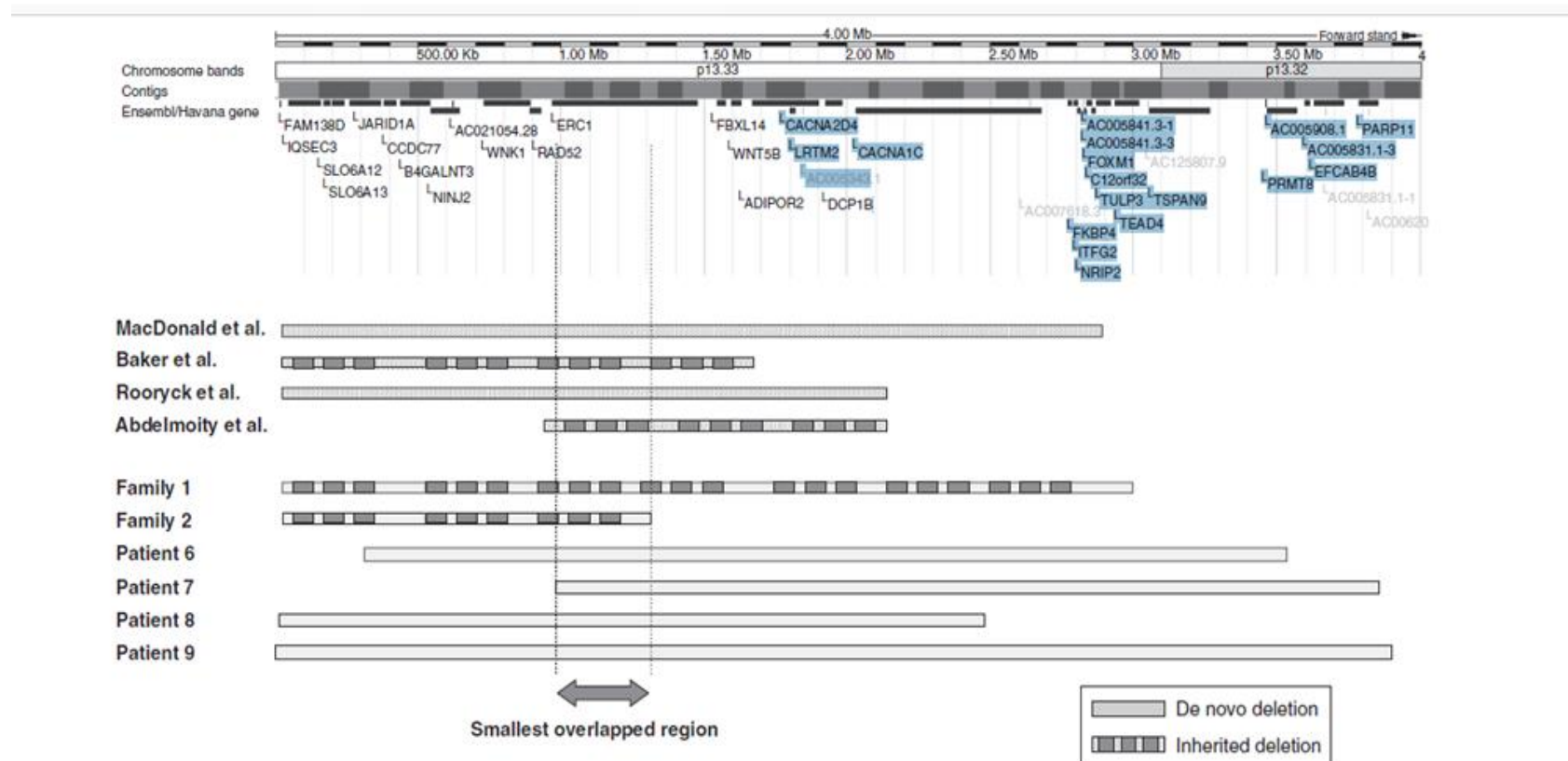
Em uma revisão sistemática, a DI foi descrita em 76,9% dos relatos de microdeleção 12p13.33, mas nenhum caso demonstrou PC, Deficiência Visual e Auditiva. Talvez até a presente data, este seja o primeiro relato de quadro clínico grave em CNVs da região 12p13.33 e pode ser resultado de expressão variável e penetrância incompleta (THEVENON et al, 2013, SILVA et al, 2014).

As manifestações clínicas da microduplicação 12p13.33 não são claras e a trissomia parcial “pura” foi descrita em um paciente com TEA e AGD (Genome browser UCSC; construção hg 19, coordenadas genômicas chr12: 1.202.907-1.601.450) (Decipher, paciente nº 357942). Outro relato avaliou uma criança com mutação combinada dessa região, que incluiu a região 12p13.33 (907.478–1.209.760) x3 e a 21q22.3 (45,574,299-45,884,738) x3 (MEKKAWY et al, 2016).

A síndrome de duplicação 12p é uma anormalidade cromossômica rara, que resulta da má segregação de uma translocação equilibrada dos pais e, geralmente, está associada a outros desequilíbrios cromossômicos. Sinais e sintomas associados a essas mutações são DI/AGD e anomalias craniofaciais. Embora a síndrome de duplicação 12p inclua a região 12p13.33, a maioria dos estudos descreve grandes duplicações, as quais se estendem de 12p12 à 12pter e que comprometem múltiplos genes. Em função destas características, a correlação genótipo-fenótipo para estas aberrações cromossômicas fica demasiadamente prejudicada (POIRSIER et al, 2014; LEISER et al, 2016).

Em uma revisão sistemática, Thevenon e colaboradores (2013) descreveram 13 casos com microdeleção 12p13.33, estas com tamanho entre 1.3Mb e 4.79Mb. Sete destas alterações foram *de novo*, cinco foram herdadas e os dados não estavam disponíveis em um caso. Em todos os pacientes, a menor região de sobreposição destas deleções possuía tamanho de 260kb e englobava apenas o gene *ELKS/ERC1* (Figura 20).

Figura 20 - Alinhamento das deleções identificadas por array-CGH e descritas pela revisão sistemática de Thevenon e colaboradores (2013). A menor região de sobreposição em todos os pacientes (260 kb) contém apenas o gene *ELKS / ERC1*.



O presente estudo está de acordo com estes resultados, ao demonstrar um caso de rearranjo cromossômicos complexo, que envolveu apenas o gene *ELKS / ERC1*. As áreas de microduplicação desta alteração comprometeram numerosos exons e, apesar de seu pequeno tamanho, a microdeleção central comprometeu três exons, as quais são expressos em todas as transcrições de *ELKS / ERC1* (UCSC Genome Browser construção *hg19*, coordenadas genômicas chr12: 1.291.079 -1.317.638).

Apesar de sua complexidade, a mutação deve ter desencadeado uma haploinsuficiência, pois a deleção dos exons levaria à formação de uma proteína anômala ou impediria sua produção. A manifestação clínica apresentada pelo paciente avaliado suporta esta hipótese.

ELKS / ERC1 é expresso em diferentes regiões do cérebro, com maior expressão na amígdala e no tálamo (UCSC Genome Browser construção *hg19*; coordenadas genômicas chr12: 1.100.404-1.605.0990). *ELKS / ERC1* codifica um membro das proteínas de ligação a RIM e pode estar envolvido na organização da matriz das células da zona ativa dos terminais nervosos, esta que regula a liberação de neurotransmissores. Diversos estudos demonstraram seu importante papel no transporte retrógrado dos endossomos para o Golgi e na reciclagem independente de COPI das enzimas do Golgi para o retículo endoplasmático (NAKATA et al, 1999; KIKUNO et al, 1999; GRIGORIEV et al, 2007; MORAR et al, 2011).

Os dados obtidos nesta pesquisa sugerem a existência da Síndrome de Microdeleção 12p13.33 e, mais audaciosamente, a Síndrome de Deleção de *ELKS / ERC1*. A confirmação ou descarte dessa hipótese só será possível com estudos funcionais envolvendo o gene *ELKS / ERC1* e por meio de pesquisas envolvendo o sequenciamento da região 12p13.33.

6.2.4.5. Paciente 16

Neste indivíduo, o exame molecular (CMA) evidenciou uma deleção de 1,5Mb na região 2q12.2q12.3 e a avaliação clínica demonstrou baixa estatura,

baixo peso, microcefalia, malformações renais, Deficiência Intelectual grave, Deficiência Auditiva e Epilepsia. Concomitantemente, a paciente apresentou uma mielomeningocele toracolombar, como também, os seus distúrbios associados (hidrocefalia, malformação de costelas, paralisia flácida de MI e bexiga neurogênica). Os estudos anteriores observaram que, defeitos cromossômicos nesta região estiveram associados com a DI, a microcefalia e os dismorfismos faciais inespecíficos (GRIGGS et al, 2009; DHEEDENE et al, 2013). A busca em banco de dados retornou com 27 casos de deleções em 2q12.2q12.3 (*DECIPHER*, 2018). Em ordem de frequência, os sintomas observados nestes casos foram a Deficiência Intelectual, o TEA, a microcefalia, a macrocefalia, a baixa estatura, a Epilepsia e a Hidrocefalia.

Desta forma, os fenótipos dos relatos prévios foram muito semelhantes ao do indivíduo avaliado, como também, várias microdeleções foram equiparadas a este caso em tamanho e posições afetadas. No paciente 16, os genes acometidos pelo defeito cromossômico não foram associados com doenças (*PLGLA*, *RGPD3* e *ST6GAL2*), porém, se torna necessário o sequenciamento e estudo funcional destes, para elucidar os seus papéis nos quadros clínicos apresentados (GRIGGS et al, 2009; DHEEDENE et al, 2013; *DECIPHER*, 2018).

Os distúrbios de fechamento do tubo neural são a segunda causa mais frequente de malformações e perdem somente para os defeitos cardíacos congênitos (DETRAIT et al, 2005). Os DFTN apresentam etiologia heterogênea e estima-se que entre 60 e 70% possuam um componente genético. Outros fatores etiológicos associados aos DFTN são carências nutricionais (folatos), doenças maternas (diabetes gestacional) e uso de medicações (Valproato de Sódio) (GREENE, COPP, 2014). Os genes responsáveis por estas malformações ainda precisam ser melhor estudados, porém, alguns destes já foram identificados (*VANGL1*- OMIM 610132, *VANGL2* - OMIM 600533, *FUZ* – OMIM 610622, *CELSR1* – OMIM 604523, entre outros) (LEI et al, 2014; LUPO et al, 2017; OMIM, 2018).

Em relação ao DFTN encontrado no indivíduo do estudo, os genes acometidos pela microdeleção não estão sob suspeição, não foram

correlacionados e não aumentaram a susceptibilidade para estas malformações. Desta forma, o sequenciamento dos genes já correlacionados com os DFTNs e do exoma seriam fundamentais para elucidar a etiologia da meningocele deste paciente (GREENE, COPP, 2014; LUPO et al, 2017; OMIM, 2018).

Não pode ser descartada a interferência da deformidade medular e de suas desordens associadas no quadro clínico do paciente. A hidrocefalia pode ter desencadeado a DI, Deficiência Auditiva e a Epilepsia. A alteração de MI pode ter desencadeado a baixa estatura e baixo peso. Entretanto, o DFTN não justifica toda a sintomatologia observada e seria mais provável que o quadro clínico, seja a soma dos sintomas desencadeado por este e do fenótipo da microdeleção em 2q12.2q12.3 (GREENE, COPP, 2014).

6.2.4.6. Paciente 17

Neste indivíduo, uma microdeleção em 1q21.1q21.2 foi detectada pelos exames moleculares. Esta região apresenta múltiplas sequências de repetição de baixo número de cópias com alta homologia (LCR), o que a torna susceptível para deleções e duplicações recorrentes. A região 1q21.1 apresenta duas regiões susceptíveis a CNVs: uma região proximal, que se estende da posição 145.4 à 145.6Mb (200Kb, GRCh37/h19.) e uma região distal, a qual possui tamanho de 1,35Mb (chr1: 146,5-147,9 Mb, GRCh37 / h19) (WANG et al, 2017). A região crítica para o desencadeamento dos sintomas possui tamanho de 1,35 Mb e se localiza entre as posições cromossômicas 145.000.000 e 146.350.000 (GRCh37 / h19). No caso deste estudo, a região crítica foi afetada pelo rearranjo cromossômico (chr1: 145.764.678 a 148.520.164, GRCh37 / h19 (BUSE et al, 2017).

As microdeleções na região 1q21.1 podem surgir *de novo* (47,1%), herdadas de pais moderadamente afetados (17,6%) e recebidas de um progenitor não afetado (35,3%). Nos pacientes acometidos, a alta variabilidade fenotípica torna controverso a denominação de uma Síndrome da Microdeleção 1q21; este fato também ocorre para os indivíduos com microduplicações na mesma região (DI, macrocefalia e TEA). Várias possibilidades podem explicar

este fenômeno e incluem a variação genética de fundo, fenômenos epigenéticos (*imprint* genômico, variabilidade de expressão e penetrância) e o desmascaramento de variantes recessivas no alelo remanescente (MEFFORD et al, 2008).

De maneira geral, as CNVs com perdas na região 1q21 se manifestam com DI/AGD, TEA, dismorfismos faciais inespecíficos, microcefalia, baixa estatura, epilepsia e outros distúrbios de comportamento, como também, com malformações cardíacas, ósseas, oculares e renais. O Quadro 8 apresenta uma comparação entre os sintomas dos casos dos estudos prévios e os da paciente avaliada (MEFFORD et al, 2008; BASEL-VANAGAITE et al, 2011; GAMBA et al, 2016; BUSE et al, 2017; WANG et al, 2017).

Quadro 8 – Correlação entre as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes dos estudos prévios com microdeleção em 1q21.1 e as do caso avaliado.

Fenótipos da microdeleção 1q21.1 descritos em estudos prévios	Caso 17
DI/AGD	+
Microcefalia	+
Dismorfismos faciais	+
TEA	-
Epilepsia	+
Baixa estatura	+
Outros distúrbios de comportamento	-
Malformação cardíaca	-
Malformação ocular	-
Malformação renal	+
Malformação óssea	+

Em relação à mielomeningocele sacral da paciente do estudo, a região 1q21.1q21.2 e seus genes não foram correlacionados com os DFTN, como também, não estão sob suspeição (OMIM, 2018). Nos casos descritos anteriormente, um relato apresentou encefalocele (WANG et al, 2017) e outro

continha uma hemivértebra sacral (GAMBA et al, 2016). A prevalência dos distúrbios de fechamento do tubo neural na população em geral é alta, desta forma, a presença destes casos entre as centenas de relatos de microdeleção 1q21.1q21.2 é estatisticamente esperada (MEFFORD et al, 2008).

No paciente avaliado, a região deletada apresentou numerosos genes e vários destes estão sendo avaliados, no intuito de correlacioná-los com as manifestações fenotípicas. A família *NBPF* (*neuroblastoma breakpoint family*) possui 24 genes, sendo que, os membros acometidos pela anomalia cromossômica do indivíduo estudado foram o *NBPF8*, o *NBPF10*, o *NBPF11*, o *NBPF12*, o *NBPF14*. Esta família de genes codifica o domínio DUF1220 de diversas proteínas, que parece estar associado com variações patológicas no tamanho do cérebro e no volume do neocórtex. A haploinsuficiência do domínio DUF1220 foi associada com a microcefalia, enquanto que, o excesso deste foi correlacionado com a macrocefalia (BUSE et al, 2017).

O gene *GJA5* (*gap junction protein alpha-5 gene*) codifica a proteína conexina 40, que pode ser responsável pelas malformações cardíacas dos pacientes com deleção 1q21.1 e o *GJA8* (*gap junction protein alpha-8 gene*) codifica a proteína conexina 50, a qual está sendo investigada como desencadeadora das malformações oculares destes. Apesar dos dois genes terem sido afetados pela deleção do caso 17 desta pesquisa, este não apresentava alterações cardíacas e oculares (MEFFORD et al, 2008).

CHD1L (*chromodomain helicase dna-binding protein 1-like gene*) participa do processo de remodelamento e relaxamento da cromatina, sendo que, o seu papel nas manifestações clínicas das CNVs em 1q21.1, não está claro. Da mesma forma, *PRKAB2* (*protein kinase amp-activated beta-2 gene*) codifica a subunidade $\beta 2$ da AMPK (*AMP-activated protein kinase*) e regula a resposta celular a diferentes estímulos externos; esta proteína parece ter papel importante no funcionamento cerebral (BUSE et al, 2017).

Em camundongos, mutações homozigotas que inativam o gene *HYDIN* (*hydrocephalus-inducing gene*) desencadeiam hidrocefalia. Para os demais genes afetados pela CNV, pouco se sabe sobre a correlação entre suas

mutações e as alterações fenotípicas desencadeadas (BRUNETTI PIERRI et al 2008).

6.2.4.7. Paciente 20

Neste estudo foi avaliado uma paciente com deleção em 9p24.3, que envolvia apenas o gene *KANK1*. O seu fenótipo foi caracterizado por hidranencefalia, paralisia cerebral tetraplégica espástica congênita, Deficiência Intelectual profunda, Epilepsia e dismorfismos faciais.

KANK1 (*KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1*, OMIM 607704) codifica uma proteína envolvida na regulação da polimerização da actina e da motilidade celular. O gene foi identificado como um supressor tumoral para diversos tipos de câncer, em especial, o carcinoma renal. Este gene é universalmente expresso nos tecidos fetais, inclusive no Sistema Nervoso Central. Os estudos prévios demonstraram que *KANK1* pode estar envolvido na etiologia de doenças comportamentais e relacionadas com o sistema nervoso (ZIMONJIC et al, 1995; HUANG et al, 1999; SIMON et al, 2000; SHAO et al, 2000; KAKINUMA et al, 2008).

A deleção de *KANK1* foi associada à DI e paralisia cerebral congênita em alguns poucos estudos. Em quatro gerações de uma família, nove crianças apresentavam ventriculomegalia, atrofia cerebral, DI e Paralisia Cerebral tetraplégica. Uma deleção de 225kb do *KANK1* foi herdada de pais não afetados por cada uma dessas crianças. Nestes infantes, o *KANK1* não foi expresso nos linfoblastos, enquanto que em seus pais saudáveis, a expressão de *KANK1* não se desviou dos controles. Esse padrão foi interpretado como uma expressão monogênica, esta desencadeada por um *imprint* parental (materno), onde o gene é expresso apenas a partir do alelo paterno (LERER et al, 2005).

Ao avaliar três gerações de sua família, um estudo identificou um indivíduo com uma deleção de *KANK1* herdada paternalmente e que apresentava TEA, atraso motor e Deficiência Intelectual. Por outro lado, seus dois irmãos, que também receberam a deleção do pai, não apresentaram estes

sintomas. Este fato sugere que: em membros de uma mesma família e portadores de CNVs idênticas, o grau de penetrância e a expressão variável interferem nos sintomas desencadeados por mutações em *KANK1*; o *imprint* parental pode não estar associado à fisiopatologia destes rearranjos cromossômicos (VANZO et al, 2013; SEGEL et al, 2015).

No presente caso, os pais da paciente não estavam disponíveis para análise, desta forma, não foi possível avaliar as particularidades da herança da deleção ou verificar se os pais eram saudáveis.

Na tentativa de esclarecer o papel das CNVs envolvendo o gene *KANK1* no fenótipo clínico, um estudo recente realizou uma revisão da literatura, além de análise cromossômica por microarranjos de 28 pacientes com CNVs envolvendo *KANK1*. Dezesesseis desses pacientes apresentaram deleções de *KANK1*, todos exibiram AGD/DI e/ou Transtorno do Espectro Autista, dois apresentaram Epilepsia e apenas um apresentou PC. Doze desses participantes demonstraram duplicação do *KANK1*, todos eles também exibiam AGD/DI e/ou Transtorno do Espectro Autista, dois apresentaram Epilepsia e apenas um apresentou PC. Após a análise desses pacientes e revisão da literatura, os autores propuseram que as CNVs envolvendo *KANK1* não são causas frequentes de Paralisia Cerebral, mas podem ser um fator de risco para o AGD/DI e/ou TEA. Outra publicação relata uma deleção de *KANK1* em um paciente com PC e DI, que foi herdado de um pai saudável (SEGEL et al, 2015; VANZO et al, 2018).

A análise cromossômica por microarranjos revelou uma deleção parcial de *KANK1* (região 9p24.3) e que se localiza entre as posições 607.900 e 706.265 (98Kb) (GRCh37 / hg19). *KANK1* tem dois *splicing* alternativos. O NM_015158, o transcrito mais longo, é expresso predominantemente no coração e no rim (denominado “variante 1” no Genome browser UCSC; construção hg19; coordenadas genômicas chr9: 504.695-746.106) (SARKAR et.al, 2002, KENT et al, 2002). NM_153186, uma das transcrições mais curtas, é expressa de forma universal nos tecidos (denominada “variante 4” no Genome browser UCSC; construção hg19; coordenadas genômicas chr9: 706.806-746.106) (KAKINUMA

et al, 2008). A deleção deste caso clínico impactou apenas a região codificadora da variante 1 e não afetou a região codificadora da variante 4.

Vanzo e colaboradores (2018) postularam que as CNVs que afetam a transcrição da variante 4 são clinicamente mais relevantes (TEA, AGD e DI) e mais graves que aquelas que afetam apenas a transcrição da variante 1. O paciente deste estudo apresentava uma forma grave de Paralisia Cerebral, Deficiência Intelectual e Epilepsia, apesar de, sua deleção ter impactado apenas a transcrição da variante 1 de *KANK1*.

Este caso relembra as características clínicas da família de quatro gerações com deleção “pura” de *KANK1*, a qual os membros apresentaram atrofia cerebral, ventriculomegalia, TEA, DD, DI e Paralisia Cerebral (LERER et al, 2005). Embora o estudo mais recente indicar que o gene *KANK1* não desempenhe um papel na patogênese da PC, a variabilidade fenotípica e genotípica observada em indivíduos com Paralisia Cerebral e em doenças do neurodesenvolvimento deve ser considerada. Além de, este ser o quarto trabalho a relatar indivíduos com deleção em *KANK1* e que apresentam PC (VANZO et al, 2013).

Estudos envolvendo o sequenciamento de última geração serão importantes para aumentar nossa compreensão sobre o alelo *KANK1* e da correlação fenotípica das suas CNVs. Fatores como a variabilidade de expressão, a penetrância incompleta e os efeitos das variações genômicas também devem ser avaliados para este gene, como também, a possibilidade de as CNVs serem benignas para este *locus* (VANZO et al, 2013).

6.2.4.8. Discussão dos Achados da Análise Cromossômica por Microarranjos

Nas últimas duas décadas, os testes genéticos moleculares tornaram-se mais acessíveis e numerosos estudos foram realizados utilizando estas técnicas. A análise cromossômica por microarranjos foi amplamente utilizada em pacientes com DI/AGD e revelou um grande número de CNVs patogênicas

(microduplicações ou microdeleções). Agora, estes relatos estão sendo agrupados em revisões sistemáticas, que têm o poder de estabelecer as regiões críticas no desenvolvimento dos sintomas e os prováveis genes responsáveis (ELLISON et al, 2012; BORLOT et al, 2017).

Em pacientes com DI/AGD indeterminada, a análise cromossômica por microarranjos possui taxa de diagnóstico entre 14,7 e 28%, ou seja, pode detectar CNVs patogênicas em um sétimo até um quarto destes indivíduos. Os fatores importantes para essa variação na sensibilidade do exame são os critérios de seleção da amostra, a etnia do paciente, a qualidade da anamnese e a presença/ausência de formas graves de DI/AGD (FRIEDMAN et al, 2006; SHAFFER, KASHORK, SALEKI, 2006; ARADHYA et al, 2007; CEYLAN et al, 2018; FAN et al, 2018; VIÑAS-JORNET et al, 2018; XU et al, 2018).

Fan e colaboradores (2018) observaram que, quanto maior foi o nível de gravidade da deficiência intelectual, maior foi o percentual de variações nos números de cópias descobertas pela técnica com microarranjos. Estes pesquisadores evidenciaram que, a prevalência de CNVs patogênicas nos pacientes com DI grave foi de 33%, substancialmente maior do que a prevalência nos casos de DI moderada (22%) e leve (19%).

Em sua maioria, a amostra do presente trabalho foi composta por doentes com DI grave e profunda (92,6%). A análise cromossômica por microarranjos foi realizada em 23 dos 27 casos e CNVs patogênicas foram encontradas 30,4% dos pacientes. A taxa de detecção verificada foi maior que as observadas nos estudos prévios sem discriminação de gravidade da DI, porém, muito semelhante àquelas detectadas nos trabalhos com indivíduos portadores de DI grave (FAN et al, 2018).

Em relação às CNVs evidenciadas, a maioria das variações semelhantes foram observadas em indivíduos com as formas brandas da DI e poucos em doentes graves. Os dados encontrados neste estudo sugerem que estas CNVs também desencadeiam quadros severos de DI, sendo que, pesquisas com indivíduos intensamente comprometidos podem indicar o pleno potencial que, estes rearranjos cromossômicos possuem de desencadear sintomas

(penetrância completa e variabilidade de expressão) (VANZO et al, 2013; FERNÁNDEZ-JAÉN et al, 2014).

A diversidade das CNVs observadas foi expressiva e intrigante. Alterações extremamente raras e outras relativamente frequentes foram igualmente visualizadas. Diferentes tipos de rearranjos cromossômicos foram identificados e que compreendiam duplicações, deleções e rearranjos complexos. O tamanho das CNVs também apresentou grande variação, de forma que a menor alteração afetou 0,09Mb e a maior 2,75Mb. As sete CNVs patogênicas foram mapeadas em seis cromossômicos distintos, o que corrobora com a hipótese de uma etiologia multigênica para a DI (LERER et al, 2005; ROPERS, 2010).

Em portadores de DI/AGD e uma síndrome genética identificável, o teste genético específico para a doença deve ser o primeiro a ser realizado, porém, tal fato ocorre na minoria destes indivíduos. Desta forma, os testes moleculares não são os testes iniciais para pacientes com a Síndrome de Down, para a qual é recomendado o cariótipo convencional. Nos casos que não apresentarem uma síndrome genética identificável, a análise cromossômica por microarranjos é considerada um exame de primeira linha para a investigação etiológica. A técnica apresenta as vantagens de ter alta sensibilidade e custo intermediário, como também, de avaliar o genoma como um todo. Este fato foi ratificado pelos dados encontrados nesta pesquisa (FLORE & MILUNSKY, 2012).

7. CONCLUSÃO

A Deficiência Intelectual indeterminada, ou seja, sem etiologia definida é um grande desafio para a medicina e consiste em mais da metade dos diagnósticos. Estudos anteriores constataram fortes indícios de que, grande percentual destes casos, possuam uma etiologia genética e que a mutação ou rearranjo cromossômico que a desencadeou, não foi localizada (MAULIK et al, 2011).

Na avaliação clínica dos pacientes da VSJBC, a DI indeterminada destes indivíduos apresentou características de recorrência familiar, grave intensidade e associação com baixa estatura e peso. A DI sindrômica foi quase a totalidade dos casos e as comorbidades mais frequentemente observadas foram as deficiências múltiplas, o Transtorno do Espectro Autista, a Epilepsia, as malformações do SNC e os distúrbios cutâneos.

As correlações entre a gravidade da DI indeterminada com as outras informações pesquisadas detectaram que, com o aumento da gravidade da DI houve uma elevação no percentual de pacientes do sexo masculino, com comprometimento do IMC, com Epilepsia e com Deficiência Física. A Deficiência Auditiva, a Deficiência Visual e a baixa estatura apresentaram uma tendência em apresentar o mesmo comportamento. Já a microcefalia e o Transtorno do Espectro Autista, contrariando os estudos anteriores, não apresentaram este procedimento (MATSON, SHOEMAKER, 2009; MEFFORD, BATSHAW, HOFFMAN, 2012; HUANG et al, 2016).

Em sua maioria, os pacientes institucionalizados na VSJBC exibiram as formas graves da DI, o que demonstrou ser uma limitação do estudo. Um grande percentual de indivíduos com DI de gravidade leve (mais de 85%) foi excluído da amostragem e, desta forma, esta não representa a população com DI/AGD em geral. Entretanto, pesquisas envolvendo os casos mais severos se justificam, pois neste grupo se encontram as pessoas que se tornaram mais vulneráveis e dependentes. Em futuros esforços serão avaliados os indivíduos com a DI indeterminada em todos os seus níveis de gravidade (MEFFORD, BATSHAW, HOFFMAN, 2012).

No presente estudo, os exames de cariótipo e MLPA não apresentaram sensibilidade suficiente, para detectar as alterações genéticas envolvidas com a DI indeterminada. Por ser um exame de baixo custo, o cariótipo ainda deve ser mantido na rotina desta investigação, porém, o uso do MLPA para este fim deve ser amplamente discutido. Em nossa opinião, este método precisa ser aprimorado e ter a sua sensibilidade aumentada, para que possa ser utilizado na prática clínica.

A avaliação clínica e os exames genéticos específicos detectaram dois pacientes com síndromes genéticas identificáveis (Síndrome do X-Frágil e AEC Tipo 7). Infelizmente, a solicitação destes exames necessita que os profissionais de saúde estejam familiarizados com estas doenças, fato que é incomum para a comunidade médica. A Síndrome do X-Frágil possui alta prevalência, o exame para a sua detecção deve ser estimulado a ser solicitado em todos os casos de DI/AGD indeterminada (VAN KARNEBEECK et al, 2005a, 2005b).

Nos pacientes da amostra, a análise cromossômica por microarranjos apresentou uma alta taxa de diagnóstico e detectou CNVs em torno de um terço destes. Informações semelhantes foram encontradas nos estudos anteriores e, num futuro próximo, espera-se que este exame esteja disponível para a triagem inicial de todos os pacientes com DI/AGD indeterminada. Os casos nos quais a análise cromossômica por microarranjos se mostrou ineficaz, haverá necessidade de se empregar técnicas moleculares complexas (sequenciamento genômico de última geração), como também, de pessoas e programas de computador capazes de decifrar as informações coletadas por estes métodos (FRIEDMAN et al, 2006; SHAFFER, KASHORK, SALEKI, 2006; ARADHYA et al, 2007; CEYLAN et al, 2018; FAN et al, 2018; VIÑAS-JORNET et al, 2018; XU et al, 2018).

Até o momento, a etiologia e fisiopatologia da DI/AGD genética vem se comportando como um imenso quebra-cabeça, onde já se identificaram numerosas regiões cromossômicas envolvidas e, possivelmente, mais de 1000 genes responsáveis pelo seu aparecimento. Numerosos passos ainda precisam ser dados até que se decifre este enigma e que incluem: confirmar ou descartar o papel de cada um destes genes na DI/AGD; elucidar o papel das proteínas codificadas por estes genes na fisiopatologia da lesão neuronal; decifrar a rede

de interação gênica da etiopatogenia da DI/AGD; avaliar o nível de interferência da epigenética neste contexto; entre outros (KOCHINKE et al, 2016).

Desta forma, apesar de não ser possível a realização do sequenciamento do DNA de última geração, os dados levantados na amostra já indicaram um forte componente genético nas DI indeterminadas (36%). Até os dias atuais, o alto custo das técnicas moleculares impediu o seu uso na prática clínica rotineira, porém, a evolução da tecnologia está reduzindo continuamente estes valores e popularizando o emprego destas técnicas. Quando este fato for uma realidade mundial, haverá esperança que, um dia terminaremos de montar este quebra-cabeças e, quem sabe, tornar a DI uma manifestação passível de cura.

REFERÊNCIAS

1. Abdelmoity AT, Hall JJ, Bittel DC, Yu S. 1.39 Mb inherited interstitial deletion in 12p13.33 associated with developmental delay. *Eur J Med Genet*. 2011;54: 198–203.
2. Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A et al. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet* 2007; 8:9.
3. _____. Submicroscopic chromosome imbalance in patients with developmental delay and/or dysmorphism referred specifically for Fragile X testing and karyotype analysis. *Mol Cytogenet* 2008;1:2.
4. Aleixandre Blanquer FA, Manchón Trives I, Forniés Arnau MJ, Alcaraz Mas LA, Picó Alfonso N, Galán Sánchez F. 3q29 microduplication syndrome. *An Pediatr (Barc)* 2011; Dec; 75(6): 409-12. doi: 10.1016/j.anpedi.2011.08.002. Epub 2011 Oct 5.
5. APA. American Psychiatric Association. DSM-5: Intellectual Disability. Arlington: American Psychiatric Publishing 2013.
6. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identified novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet* 2007; A 143A:1431-1441.
7. Artigas-Pallarés J, Guitart M, Gabau-Vila E. The genetic bases of neurodevelopmental disorders. *Rev Neurol* 2013;56(Suppl 1): S23—34.
8. Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel *locus* at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Mol Autism* 2017; May 22;8:21.
9. Bagheri H, Badduke C, Qiao Y Colnaghi R, Abramowicz I, Alcantara D et al. Identifying candidate genes for 2p15p16.1 microdeletion syndrome using clinical, genomic, and functional analysis. *JCI Insight* 2016;1(3):e85461.

10. Baker E, Hinton L, Callen DF, Haan EA, Dobbie A, Sutherland GR. A familial cryptic subtelomeric deletion 12p with variable phenotypic effect (2002). *ClinGenet*. 2002;61(3):198–201.
11. Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M et al. Subtelomeric Imbalances in Phenotypically Normal Individuals. *Hum Mutat* 2007;v.10, n.28, p. 958-67.
12. Ballif BC, Theisen A, Coppinger J, Gowans GC, Hersh JH, Madan-Khetarpal S et al. Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication. *Molecular Cytogenetics* 2008; 1:8. doi:10.1186/1755-8166-1-8.
13. Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A et al. FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet* 2005;48:388–96.
14. Basel-Vanagaite L, Goldberg-Stern H, Mimouni-Bloch A, Shkalim V, Böhm D, Kohlhasse J. An emerging 1q21.1 deletion-associated neurodevelopmental phenotype. *J Child Neurol*. 2011 Jan;26(1):113-6. doi: 10.1177/0883073810377658.
15. Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat. Rev. Genet* 2007;8:639–46.
16. Bhaumik S, Watson JM, Thorp CF, Tyrer F, McGrother CW. Body mass index in adults with intellectual disability: distribution, associations and service implications: a population-based prevalence study. *J Intellect Disabil Res* 2008 Apr;52(Pt 4):287-98.
17. Bittles AH, Petterson BA, Sullivan SG, Hussain R, Glasson EJ, Montgomery PD. The influence of intellectual disability on life expectancy. *J Gerontol A Biolo Sci Med Sci* 2002;57:M470–2.
18. Borlot F, Regan BM, Bassett AS, Stavropoulos DJ, Andrade DM. Prevalence of Pathogenic Copy Number Variation in Adults With Pediatric-Onset Epilepsy and Intellectual Disability. *JAMA Neurol*. 2017 Nov 1;74(11):1301-1311. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.1775.

19. Bowley C, Kerr M. Epilepsy and intellectual disability. *J Intellect Disabil Res* 2000 Oct; 44 (Pt 5):529-43.
20. Brasil. Decreto Nº 3.298, de 20 de dezembro de 1999 [acesso em 25 abr 2015]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d3298.htm>
21. _____. Decreto Nº 3.956, de 8 de outubro de 2001 [acesso em 25 abr 2015]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2001/d3956.htm>
22. _____. Decreto Nº 6.949, de 25 de agosto de 2009 [acesso em 25 abr 2015]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2009/decreto/d6949.htm>
23. _____. Portaria Nº 199/2014, de 30 de janeiro de 2014 [acesso em 25 abr 2015]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.htm>
24. Brasil.IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Brasileiro 2010 [acesso em 10 maio 2014]. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=go&tema=censodemog2010defic>>
25. Brasil.SDHPR – Secretaria de Direitos Humanos da Presidência da República, SNPD – Secretaria Nacional de Promoção dos Direitos da Pessoa com Deficiência. Censo Brasileiro 2010 [acesso em 04 maio 2015]. Disponível em: <<http://www.pessoacomdeficiencia.gov.br/app/indicadores/censo-2010>>
26. Bronberg RA, Alfaro EL, Bejarano IF, Dipierri JE. Prevalence of malnutrition in institutionalized intellectually disabled patients. *Medicina (B Aires)* 2011;71(1):1-8.
27. Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet.* 2008; 40:1466-1471.
28. Buse M, Cuttaia HC, Palazzo D, Mazara MV, Lauricella SA, Malacarne M et al. Expanding the phenotype of reciprocal 1q21.1 deletions and

- duplications: a case series. *Ital J Pediatr.* 2017 Jul 19;43(1):61. doi: 10.1186/s13052-017-0380-x.
29. Carter TC, Sicko RJ, Kay DM, Browne ML, Romitti PA, Edmunds ZL et al. Copy-number variants and candidate gene mutations in isolated split hand/foot malformation. *J Hum Genet* 2017; Oct;62(10):877-884.
 30. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). 2018 [acesso em 24/09/2018]. Disponível em: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>>
 31. Ceylan AC, Citli S, Erdem HB, Sahin I, Acar Arslan E, Erdogan M. Importance and usage of chromosomal microarray analysis in diagnosing intellectual disability, global developmental delay, and autism; and discovering new loci for these disorders. *Mol Cytogenet.* 2018 Sep 24;11:54. doi: 10.1186/s13039-018-0402-4. eCollection 2018.
 32. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 2006;38:75–81.
 33. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics* 2011 Londres; 14 ago; p. 838-849.
 34. Coronado R, Macaya-Ruíz M, Arjonilla JG, Roig-Quilis M. Concordancia entre una función de crecimiento del perímetro cefálico y la discapacidad intelectual en relación con la etiología de la microcefalia. *An Pediatr (Barc)* 2015; Aug;83(2):109-16.
 35. Cossio-Bolaños M, Vidal-Espinoza R, Lagos-Luciano J, Gómez-Campos, R. Nutritional status in children with intellectual disabilities based on anthropometric profile. *Rev Chil Pediatr* 2015; Jan-Feb;86(1):18-24.
 36. De Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am. J. Hum. Genet* 2005;77, 606–616.
 37. Decipher versão 9p25. 2018 [acesso em 24/09/2018]. Disponível em: <<https://decipher.sanger.ac.uk/>>

38. Des Portes V, Livet MO, Vallée L. Groupe de travail de la Société française de neuropédiatrie (SFNP) sur les retards mentaux (2002). A practical diagnostic approach to mental deficiency in 2002. *Arch Pediatr* 9:709–725.
39. Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol. Teratol.* 27: 515-524, 2005.
40. Dheedene A, Maes M, Vergult S, Menten B. A de novo POU3F3 Deletion in a Boy with Intellectual Disability and Dysmorphic Features. *Mol Syndromol*. 2014 Jan;5(1):32-5. doi: 10.1159/000356060. Epub 2013 Nov 2.
41. Ellison JW, Ravnan JB, Rosenfeld JA, Morton SA, Neill NJ, Williams MS et al. Clinical utility of chromosomal microarray analysis. *Pediatrics*. 2012 Nov;130(5):e1085-95. doi: 10.1542/peds.2012-0568. Epub 2012 Oct 15.
42. Fan Y, Wu Y, Wang L, Wang Y, Gong Z, Qiu W et al. Chromosomal microarray analysis in developmental delay and intellectual disability with comorbid conditions. *BMC Med Genomics*. 2018 May 24;11(1):49. doi: 10.1186/s12920-018-0368-4.
43. Fanizza I, Bertuzzo S, Beri S, Scalera E, Massagli A, Sali ME, et al. Genotype-phenotype relationship in a child with 2.3 Mb de novo interstitial 12p13.33-p13.32 deletion. *Eur J Med Genet*. 2014 Jul;57(7):334-8. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.04.009. Epub 2014 Apr 26.
44. Faria RS, de Oliveira CP, da Costa MM, da S Rosa MT, Córdoba MS, Pic-Taylor A et al. Concurrent Loss of Heterozygosity and Mosaic Deletion of 12p13.32pter. *Cytogenet Genome Res*. 2016;148(2-3):174-8. doi: 10.1159/000445853. Epub 2016 Jun 2.
45. Fernández-Jaén A, Castellanos Mdel C, Fernández-Perrone AL, Fernández-Mayoralas DM, de la Vega AG, Calleja-Pérez B et al. Cerebral palsy, epilepsy, and severe intellectual disability in a patient with 3q29 microduplication syndrome. *Am J Med Genet A* 2014; Aug; 164A(8): 2043-7. doi: 10.1002/ajmg.a.36559. Epub 2014 May 16.
46. Flore LA, Milunsky JM. Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. *Semin Pediatr Neurol* 2012;19, 173–180, doi: 10.1016/j.spen.2012.09.004.

47. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006;79:500-513.
48. Gamba BF, Zechi-Ceide RM, Kokitsu-Nakata NM, Vendramini-Pittoli S, Rosenberg C, Krepischi Santos AC et al. Interstitial 1q21.1 Microdeletion Is Associated with Severe Skeletal Anomalies, Dysmorphic Face and Moderate Intellectual Disability. *Mol Syndromol*. 2016 Nov;7(6):344-348. Epub 2016 Oct 26.
49. Goobie S, Knijnenburg J, Fitzpatrick D, Sharkey FH, Lionel AC, Marshall CR et al. Molecular and clinical characterization of de novo and familial cases with microduplication 3q29: guidelines for copy number variation case reporting. *Cytogenetic and Genome Research* 2008; 123, 65–78.
50. Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annu Rev Neurosci*. 2014;37:221-42. doi: 10.1146/annurev-neuro-062012-170354.
51. Griggs BL, Ladd S, Decker A, DuPont BR, Asamoah A, Srivastava AK. Identification of ectodysplasin-A receptor gene deletion at 2q12.2 and a potential autosomal MR locus. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 30–36.
52. Grigoriev I, Yu KL, Martinez-Sanchez E, Serra-Marques A, Smal I, Meijering E, et al. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr Biol*. 2011 Jun 7;21(11):967-74. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.030. Epub 2011 May 19.
53. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin. Genet* 2013;84, 415–421.
54. Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet* 2009; 18:R1–R8.
55. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* 2011;135:174–202.
56. Hoey E, Staines A, Walsh D, Corby D, Bowers K, Belton S et al. An examination of the nutritional intake and anthropometric status of

- individuals with intellectual disabilities: Results from the SOPHIE study. *J Intellect Disabil* 2017; Dec;21(4):346-365.
57. Huang SF, Hsu HC, Fletcher JA. Investigation of chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 111:21–27.
 58. Huang J, Zhu T, Qu Y, Mu D. Prenatal, Perinatal and Neonatal Risk Factors for Intellectual Disability: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016 Apr 25;11.
 59. Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet* 2011; 54:425–432.
 60. Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, Pinkel D, Kallioniemi OP. Gene copy number analysis by fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Methods* 1996; n.9, p.113–121.
 61. Kakinuma N, Roy BC, Zhu Y, Wang Y, Kiyama R. KANK regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol* 2008; 181:537–549.
 62. Katz G, Lazcano–Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Pública Méx* 2008;50(2):132–141.
 63. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of Neurodevelopment Disorders* 2010; Londres. 29 jul.;p. 182-209.
 64. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.
 65. Kikuno R, Nagase T, Ishikawa K, Hirosawa M, Miyajima N, Tanaka A, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA* 1999; Res. 6: 197-205.
 66. Kochinke K, Zweier C, Nijhof B, Fenckova M, Cizek P, Honti F et al. Systematic Phenomics Analysis Deconvolutes Genes Mutated in

- Intellectual Disability into Biologically Coherent Modules. *The American Journal of Human Genetics* 2016; 98: 149-164.
67. Kwon SS, Kim J, Shin S, Lee ST, Lee KA, Choi JR. Deletion of 20p13 and Duplication of 20p13p12.3 in a Patient with Delayed Speech and Development. *Ann Lab Med* 2018;Jan;38(1):77-79. doi: 10.3343/alm.2018.38.1.77.
 68. Laczmanska I. Multiplex Ligation - dependent Probe Amplification (MLPA) as a screening test in children with developmental defects and intellectual disability of unknown etiology. *Med Wieku Rozwoj* 2011; Apr-Jun;15(2):132-9.
 69. Lee KY, Shin E. Application of array comparative genomic hybridization in Korean children under 6 years old with global developmental delay. *Korean J Pediatr* 2017. Sep;60(9):282-289. doi: 10.3345/kjp.2017.60.9.282. Epub; Sep 21.
 70. Lei Y, Zhu H, Yang W, Ross ME, Shaw GM, Finnell RH. Identification of novel CELSR1 mutations in spina bifida. *PLoS One* 9: e92207, 2014.
 71. Leyser M, Dias BL, Coelho AL, Vasconcelos MM, Nascimento OJ. 12p deletion spectrum syndrome: a new case report reinforces the evidence regarding the potential relationship to autism spectrum disorder and related developmental impairments. *Molecular Cytogenetics* 2016; 9:75 DOI 10.1186/s13039-016-0278-0.
 72. Leonard H, Wen X. The Epidemiology of Mental Retardation: Challenges and Opportunities in the New Millenium. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 2002; Hoboken, maio; 8, p.117-134, 23.
 73. Lerer I, Sagi M, Meiner V, Cohen T, Zlotogora J, Abeliovich D. Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent of origin dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Hum. Mol. Genet* 2005; 14, 3911–3920.
 74. Lévy J, Coussement A, Dupont C, Guimiot F, Baumann C, Viot G et al. Molecular and clinical delineation of 2p15p16.1 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2017; Aug;173(8):2081-2087. doi: 10.1002/ajmg.a.38302. Epub 2017 Jun 1.

75. Lisi EC, Hamosh A, Doheny KF, Squibb E, Jackson B, Galczynski R et al. 3q29 interstitial microduplication: a new syndrome in a three-generation family. *Am J Med Genet A* 2008;146A:601–609. doi: 10.1002/ajmg.a.32190.
76. López-Pisón J, García-Jiménez MC, Monge-Galindo L, Lafuente-Hidalgo M, Pérez-Delgado R, García-Oguiza A et al. Our experience with the aetiological diagnosis of global developmental delay and intellectual disability: 2006-2010. *Neurologia* 2014;29(7):402-7.
77. Lupo PJ, Agopian AJ, Castillo H, Castillo J, Clayton GH, Dosa NP et al. Genetic epidemiology of neural tube defects. *J Pediatr Rehabil Med*. 2017 Dec 11;10(3-4):189-194. doi: 10.3233/PRM-170456.
78. Macdonald AH, Rodríguez L, Aceña I, Martínez-Fernández ML, Sánchez-Izquierdo D, Zuazo E, et al. Subtelomeric deletion of 12p: Description of a third case and review. *Am J Med Genet A*. 2010;152A (6): 1561–6. doi:10.1002/ajmg.a.33401.
79. Madrigal I, Martinez M, Rodriguez-Revenge L, Carrio A, Mila M. 12p13 rearrangements: 6 Mb deletion responsible for ID/MCA and reciprocal duplication without clinical responsibility. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:1071–6.
80. Matson JL, Shoemaker M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities* 2009; volume 30, Issue 6, November–December, Pages 1107-1114.
81. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities* 2011;32:419–436.
82. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med*. 2008; 359:1685-1699.
83. Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability and autism. *N. Engl. J. Med* 2012;366, 733–743.
84. Mekrawy MK, Mazen IM, Kamel AK, Vater I, Zaki MS. Genotype/phenotype correlation in a female patient with 21q22.3 and 12p13.33 duplications. *Am J Med Genet A*. 2016 Apr;170A(4):1050-8. doi: 10.1002/ajmg.a.37523. Epub 2016 Jan 8.

85. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960 Sep;20:613-6.
86. Morar B, Zhelyazkova S, Azmanov DN, Radionova M, Angelicheva D, Guergueltcheva V, et al. A novel GEFS+ locus on 12p13.33 in a large Roma family. *Epilepsy Res.* 2011 Nov;97(1-2):198-207. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2011.08.009. Epub 2011 Sep 13.
87. Muñoz-Quezada MT, Lucero-Mondaca BA. Atención Psicológica en Estudiantes con Retos Múltiples: Algunas Sugerencias Metodológicas. *Límite* 2011, vol. 6, núm. 23:57-72.
88. _____. Evaluación de Procedimientos para el Diagnóstico Discapacidad Intelectual en Estudiantes Con Discapacidades Múltiples. *Ajayu* 2017; mar., vol.15, no.1.
89. Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, et al. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 97-103.
90. Nobre MIRS, Gagliardo HGRG, Carvalho KM, Boteca MBS, Sampaio PR. Múltipla Deficiência e Baixa Visão. *Rev. Neurociências* 1998; 6(3): 111-113.
91. OEA. Convenção Interamericana para a Eliminação de Todas as Formas de Discriminação contra as Pessoas Portadoras de Deficiência 1999 [acesso em 25 abr 2015]. Disponível em: <<http://www.oas.org/juridico/english/treaties/a-65.html>>
92. ONU. Convenção Internacional sobre os Direitos das Pessoas com Deficiências 2007 [acesso em 25 abr 2015]. Disponível em: <<http://www.un.org/disabilities/convention/conventionfull.shtml>>
93. Poirsier C, Landais E, Bednarek N, Nobecourt JM, Khoury M, Schmidt P, et al. Report on 3 patients with 12p duplication including GRIN2B. *Eur J Med Genet.* 2014 Apr;57(5):185-94. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.12.009. Epub 2014 Feb 3.
94. Rajamani KT, Wagner S, Grinevich V, Harony-Nicolas H. Oxytocin as a Modulator of Synaptic Plasticity: Implications for Neurodevelopmental

- Disorders. *Front Synaptic Neurosci* 2018;Jun 19;10:17. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00017. eCollection 2018.
95. Rajcan-Separovic E, Harvard C, Liu X, McGillivray B, Hall JG, Qiao Y et al. Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. *J Med Genet* 2007;44(4):269–276.
 96. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 2063-74.
 97. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D et al. Subtelomere FISH analysis of 11,688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J. Med. Genet* 2005. 30 September.
 98. Robertson J, Hatton C, Emerson E, Baines S. Prevalence of epilepsy among people with intellectual disabilities: A systematic review 2015; *Seizure*. Jul; 29:46-62.
 99. Rodrigues RM. Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido 2010. 135p. Tese (Mestrado). Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo. Bauru, São Paulo.
 100. Rollins JD, Collins JS, Holden KR. United States head circumference growth reference charts: birth to 21 years. *J Pediatr* 2010; 156:907–13. (913 e1-2).
 101. Rooms L, Vandeweyer G, Reyniers E, van Mol K, de Canck I, Van der Aa N et al. Array-based MLPA to detect recurrent copy number variations in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A* 2011; Feb;155A(2):343-8. doi: 10.1002/ajmg.a.33810. Epub 2011 Jan 14.
 102. Ropers, HH. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. *Annual Review of Genomics and Human Genetic* 2010; Palo Alto, Ca, set.; v. 11, p.161-187.
 103. Sarkar S, Roy BC, Hatano N, Aoyagi T, Gohji K, Kiyama R. A novel ankyrin repeat-containing gene (Kank) located at 9p24 is a growth suppressor of renal cell carcinoma. *J Biol Chem* 2002; 277:36585–36591.

104. Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley M. Intellectual disability: Definition, classification, and systems of supports. 11th ed. Washington: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities; 2010.
105. Scheres M. Human chromosome banding. *Lancet*. 1972 Apr 15;1(7755):849.
106. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30, e57.
107. Segel R, Ben-Pazi H, Zeligson S, Fatal-Valevski A, Aran A, Gross-Tsur V et al. Copy number variations in cryptogenic cerebral palsy. *Neurology* 2015; Apr 21; 84(16):1660-8. Doi: 10.1212/WNL.0000000000001494.
108. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 150 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 2006; 149: 98-102.
109. Shao J, Li Y, Li H, Wu Q, Hou J, Liew C. Deletion of chromosomes 9p and 17 associated with abnormal expression of p53, p16/MTS1 and p15/MTS2 gene protein in hepatocellular carcinomas. *Chin Med J* 2000; 113:817–822.
110. Shimbo H, Yokoi T, Aida N, Mizuno S, Suzumura H, Nagai J et al. Haploinsufficiency of BCL11A associated with cerebellar abnormalities in 2p15p16.1 deletion syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2017;5(4):429-437. doi:10.1002/mgg3.289.
111. Shinawi M, Cheung, SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 2008; Review. n.17-18, p.760-70.
112. Silva IMV, Rosenfeld J, Antoniuk SA, Raskin S, Sotomaior VS. A 1.5 Mb terminal deletion of 12p associated with autism spectrum disorder. *Gene* May 2014, Volume 542, Issue 1, 25, Pages 83-86.
113. Silva-Costa SM da, Coeli FB, Lincoln-de-Carvalho CR, Marques-de-Faria AP, Kurc M, Pereira T et al. Screening for the GJB2 c.-3170 G>A (IVS 1+1 G>A) Mutation in Brazilian Deaf Individuals Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009; Oct;13(5):701-4.

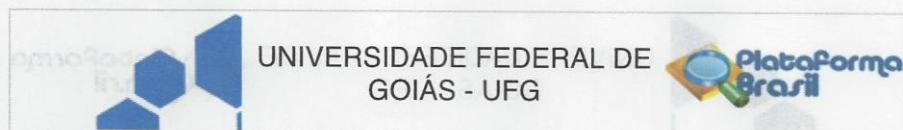
114. Simon R, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe HJ, Bocker W. Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 2000; 17:1025–1029.
115. Soblet J, Dimov I, Graf von Kalckreuth C, Cano-Chervel J, Baijot S, Pelc K et al. BCL11A frameshift mutation associated with dyspraxia and hypotonia affecting the fine, gross, oral, and speech motor systems. *Am J Med Genet A* 2018; Jan;176(1):201-208. doi: 10.1002/ajmg.a.38479. Epub 2017 Sep 27.
116. Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem* 2008; 80:9363–9368.
117. Starr LJ, Truemper EJ, Pickering DL, Sanger WG, Olney AH. Duplication of 20qter and deletion of 20pter due to paternal pericentric inversion: patient report and review of 20qter duplications. *Am J Med Genet Part A* 2014; 164A:2020–2024.
118. Stevenson RE, Schwartz CE. Clinical and molecular contributions to the understanding of X-linked mental retardation. *Cytogenet Genome Res* 2002; 99:265-275.
119. Tassano E, Uccella S, Giacomini T, Severino M, Siri L, Gherzi M et al. Interstitial 9p24.3 deletion involving only DOCK8 and KANK1 genes in two patients with non-overlapping phenotypic traits. *European Journal of Medical Genetics* 2016; (jan); 59 (1): 20-25.
120. Tassano E, Uccella S, Giacomini T, Severino M, Siri L, Gherzi M et al. 3q29 microduplication syndrome: Description of two new cases and delineation of the minimal critical region. *Eur J Med Genet* 2018; Mar 1. pii: S1769-7212(17)30430-5. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.02.011.
121. Tassé MJ, Luckasson R, Nygren M. AAIDD proposed recommendations for ICD-11 and the condition previously known as mental retardation. *Intellect Dev Disabil* 2013; 51:127–131.
122. Thevenon J, Callier P, Andrieux J, Delobel B, David A, Sukno S, et al. 12p13.33 microdeletion including ELKS/ERC1, a new locus associated with childhood apraxia of speech. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(1):82–8. doi:10.1038/ejhg.2012.116.

123. Torres VM, Saddi VA. Systematic review: hereditary thrombophilia associated to paediatric strokes and cerebral palsy. *J Pediatr (Rio J)* 2015;91(1):22–9.
124. Tucker T, Montpetit A, Chai D, Chan S, Chénier S, Coe BP et al. Comparison of genome-wide array genomic hybridization platforms for the detection of copy number variants in idiopathic mental retardation. *BMC Med Genomics* 2011; 4:25.
125. University of California Santa Cruz. Genome Browser construção hg19. 2018 [acesso em 15/09/2018]. Disponível em: <<https://genome.ucsc.edu/>>
126. Vanzo RJ, Martin M, Sdano M, South S. Familial KANK1 deletion does not follow expected imprinting pattern. *Eur. J. Med. Genet* 2013; (May); 56 (5), 256–259.
127. Vanzo RJ, Twede H, Ho KS, Prasad A, Martin MM, South ST et al. Clinical significance of copy number variants involving KANK1 in patients with neurodevelopmental disorders. *Eur J Med Genet* 2018; 3. pii: S1769-7212(17)30073-3. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.04.012.
128. van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM, et al. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study. *Am J Ment Retard.* 2005 Jul;110(4):253-67.
129. Van Karnebeek CD , Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: A systematic literature review of their use- fulness. *Eur J Hum Genetic* 2005; 13:6—25.
130. Vargas H, Beldia G, Korosh W, Sudhalter V, Iqbal A, Sanchez-Lacay JA, et al. A 4.5Mb terminal deletion of chromosome 12p helps further define a psychosis-associated locus. *Eur J Med Genet.* 2012;55:573–6.
131. Viana MR. Análise Citogenética e Molecular (FISH) de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica em terapia com inibidores de tirosino quinase no Estado da Bahia 2016. 74s. Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, ICS-UFBA, BA, 2016.

132. Viñas-Jornet M, Esteba-Castillo S, Baena N, Ribas-Vidal N, Ruiz A, Torrents-Rodas D et al. High Incidence of Copy Number Variants in Adults with Intellectual Disability and Co-morbid Psychiatric Disorders. *Behav Genet*. 2018 Jun 7. doi: 10.1007/s10519-018-9902-6.
133. Vissers LE, Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol. Biol* 2012; 838, 29-75.
134. Wang HD, Liu L, Wu D, Li T, Cui CY, Zhang LZ et al. Clinical and molecular cytogenetic analyses of four families with 1q21.1 microdeletion or microduplication. *Gene Med*. 2017 Apr;19(4). doi: 10.1002/jgm.2948.
135. Werling DM, Lowe JK, Luo R, Cantor RM, Geschwind DH. Replication of linkage at chromosome 20p13 and identification of suggestive sex-differential risk loci for autism spectrum disorder. *Mol Autism* 2014; Feb 17;5(1):13. doi: 10.1186/2040-2392-5-13.
136. Wilfert AB, Sulovari A, Turner TN, Coe BP, Eichler EE. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome Medicine* 2017; 9:101.
137. Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, Donnai D et al. 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 154–160.
138. Who – World Health Organization. International Classification of Impairments, Disabilities, and Handicaps: a manual of classification relating to the consequences of disease 1989. Genebra [acesso em 04 maio 2015]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41003/1/9241541261_eng.pdf?ua=1>
139. _____, The International Classification of Functioning, Disability and Health 2001. Genebra [acesso em 04 maio 2015]. Disponível em: <<http://www.who.int/classifications/icf/en/>>
140. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am. J. Med. Genet* 2003;117C, 15–24.
141. Xu M, Ji Y, Zhang T, Jiang X, Fan Y, Geng J et al. Clinical Application of Chromosome Microarray Analysis in Han Chinese Children with Neurodevelopmental Disorders. *Neurosci Bull*. 2018 Jun 9. doi: 10.1007/s12264-018-0238-2.

142. Zimonjic DB, Simpson S, Popescu NC, Dipaolo JA. Molecular cytogenetics of human papillomavirus-negative cervical carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 82:1–8.

Anexo 1 – Relatório com a aprovação da pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL DE UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-GOÍÁS.

Pesquisador: Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 43747315.1.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.144.113

Data da Relatoria: 06/07/2015

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL DE UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-GOÍÁS. N. CAAE: 43747315.1.0000.5083. Pesquisadora Responsável: Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo.

Trata-se de um estudo com pacientes que apresentam deficiência intelectual idiopática com objetivo de realizar a triagem clínica e genética dos pacientes institucionalizados da Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás. Foram anexados os seguintes documentos: Folha de rosto envolvendo seres humanos, projeto de pesquisa, aprovação do projeto no Conselho Diretor, termo de anuência da diretora da Vila São Cottolengo, termo de compromisso dos pesquisadores, TCLE destinado ao tutor e TCLE destinado aos pais ou responsáveis legais.

Objetivo da Pesquisa:

Tem como objetivo geral realizar a triagem clínica e genética de indivíduos institucionalizados da Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás que apresentem deficiência intelectual idiopática; e como objetivos específicos: Caracterizar clinicamente os indivíduos com DI da Vila São

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

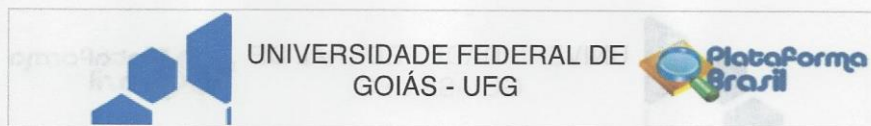
UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

José Cottolengo em Trindade, GO; Analisar o cariótipo em busca de alterações cromossômicas; Analisar as regiões subteloméricas dos cromossomos na busca de anormalidades gênicas nos casos em que o cariótipo apresentar-se normal; Obter dados socio-demográficos e o histórico genético-familiar para subsidiar políticas públicas para o indivíduo com DI; e Fornecer a consultoria genética aos indivíduos e familiares envolvidos na avaliação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos, relatam que: "A coleta do sangue periférico não colocará em risco a vida do indivíduo, visto ser um procedimento simples e realizado por profissionais capacitados. Poderá surgir um desconforto causado pela punção da agulha durante o procedimento da coleta, porém, um efeito passageiro. Na região poderá surgir um leve hematoma que desaparecerá em poucos dias."

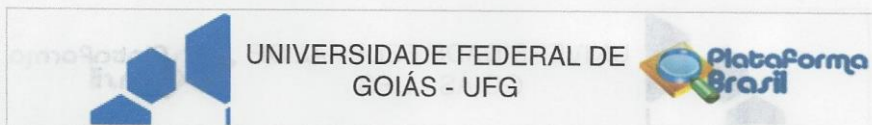
Quanto aos benefícios – aos participantes analisados: Os participantes com diagnóstico idiopático de DI institucionalizados poderão ser beneficiados com as análises citogenética e molecular, uma vez que a identificação do diagnóstico específico da DI permite se ter um melhor conhecimento a respeito do curso natural da doença. Isso possibilitaria intervenções, tais como terapia ocupacional, fisioterapia, ou intervenção medicamentosa mais diretas, as quais melhorariam a qualidade de vida do participante. Aos familiares que apresentarem histórico familiar positivo, serão convidados a participar da pesquisa tendo o acesso a todos os exames e receberão orientação genética, que para tal, será realizada de forma esclarecedora com a utilização de recursos didáticos (gravuras, desenhos, ilustrações) que auxiliam no entendimento.

Quanto aos Benefícios – a comunidade científica: a presente proposta possibilitará a formação e o treinamento de profissionais envolvidos com genética humana em diferentes especialidades, que atuam na UFG, e poderão futuramente atuar nesse campo na saúde pública. Assim, a comunidade que utiliza os serviços de saúde pública será beneficiada com os conhecimentos obtidos. Durante o desenvolvimento do estudo, os resultados parciais serão apresentados em congressos específicos da área e artigos científicos serão publicados em periódicos, além de apresentações e palestras junto a UFG e outras instituições. Outras palestras informativas poderão ser ministradas nas escolas para que os pais e responsáveis conheçam e compreendam a genética, de forma clara e facilitada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo cujos participantes serão indivíduos institucionalizados na Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás que apresentem deficiência intelectual sem causa determinada. A amostra esperada é de 30 internos da instituição, contudo, esse número

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

dependerá da avaliação inicial realizada pela equipe médica. Com relação a faixa etária, serão incluídos crianças, adolescentes e adultos com deficiência intelectual idiopática e serão excluídos indivíduos que apresentem deficiência intelectual causada por fatores exógenos.

Estes pacientes serão avaliados por uma equipe médica, que fará uma anamnese detalhada na busca de distúrbios e malformações congênitas associadas ao quadro de DI. Os indivíduos que apresentarem indicação clínica de avaliação genética serão convidados a participar do estudo. Os pacientes que não apresentarem indicação clínica na anamnese, ou cujo diagnóstico etiológico seja de DI ocasionadas por hipóxia, traumas, meningoencefalites ou outras etiologias conhecidas serão excluídos da avaliação genética.

Amostras de sangue periférico serão coletadas nos indivíduos selecionados, nas quais serão realizadas as análises genéticas. O sangue será coletado por venopunção e separado em duas alíquotas. À primeira porção será adicionada heparina sódica (BD Vacutainer Sodium Heparin 143 USP units) e encaminhada para exames de citogenética clássica. À segunda porção será coletada com o anticoagulante EDTA (BD Vacutainer K2 EDTA 7,2 mg) e direcionada para as análises moleculares. A coleta de sangue periférico será realizada no laboratório de Análises Clínicas onde os participantes estão institucionalizados. A análise dos dados será realizada utilizando-se softwares apropriados a cada metodologia proposta. Os dados obtidos serão relatados de forma descritiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente estudo será realizado com indivíduos que apresentem deficiência intelectual sem causa determinada, institucionalizados na Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás, administrada pelos Padres Redentoristas e pelas Irmãs Filhas da Caridade de São Vicente de Paulo que estiverem sob a tutela e guarda geral das Irmãs da Vila São Cotollengo, as quais são as responsáveis legais por esses indivíduos e quem autorizarão ou não a participação na pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Também participarão aqueles que estiverem sob tutela provisória na Vila, nos quais os familiares serão contatados para que a pesquisa seja apresentada e serão convidados a participar do estudo. Havendo concordância dos pais ou responsáveis, o TCLE apropriado será aplicado.

A amostra esperada é de 30 participantes da instituição, contudo, esse número dependerá da avaliação inicial realizada pela equipe médica. A idade desses indivíduos poderá variar de 1 a 40 anos de idade. Como esses participantes apresentam comprometimento intelectual e, portanto, não exercem o discernimento para concordarem ou não com a sua participação na pesquisa, o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) não será aplicado, bem como o

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

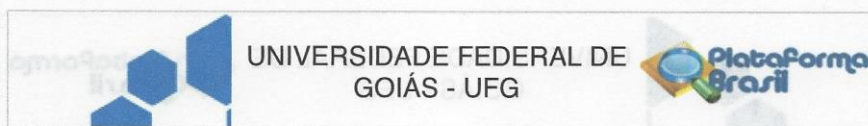
UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

TCLE para os maiores de 18 anos. O TCLE será aplicado às Irmãs detentoras da tutela e guarda dos internos ou aos pais os responsáveis.

No TCLE está garantido sigilo e privacidade, e que os resultados da pesquisa serão publicadas em relatórios científicos sem sua identificação. Não haverá qualquer valor monetário ou gratificações por ter participado da pesquisa e poderá em qualquer momento deixar a pesquisa sem qualquer consequência para a sua pessoa.

Os pesquisadores informam que toda e qualquer avaliação clínica será realizada na Vila São Cotollengo, não havendo a necessidade de se fotografar os participantes, e que a amostra de sangue a ser utilizada na presente análise será obtida quando dos procedimentos de rotina do participante no hospital, a pedido médico, não sendo, portanto, exclusividade da pesquisa. Serão utilizados uma amostra de 3ml de sangue para as análises propostas.

O cronograma está adequado. Foi apresentado o orçamento da pesquisa. Foram descritos aspectos éticos no projeto de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam todas as pendências e esclareceram todos os questionamentos feitos previamente.

Considera-se aprovado, salvo melhor juízo deste Comitê de Ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

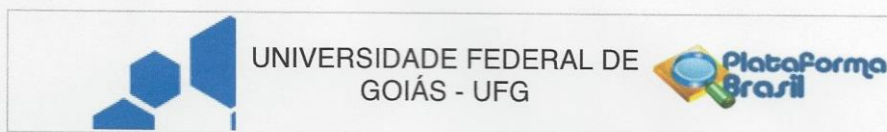
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS nº. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para 30/03/2018.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

GOIANIA, 09 de Julho de 2015

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (A) E ESCLARECIDO (A)**

Prezado (a) Senhor (a) responsável, seu (sua) tutelado (a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário (a), de uma pesquisa que oferecerá uma análise genética com a finalidade de verificar se existem alterações associadas à Deficiência Intelectual. Após entender as informações a seguir, caso aceite fazer parte do estudo e autorizar seu (sua) tutelado(a), assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você ou seu (sua) filho(a) não serão penalizados de forma alguma.

Pesquisador Responsável: Dr. Vinicius Montenegro Torres (telefone 992396083 ou vini.mtorres@gmail.com)

Equipe: Dra. Nádia Aparecida Bérghamo, sob supervisão da Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo (ICB-UFG, tel. 3551-1481).

Informações sobre a pesquisa

Projeto: “Caracterização clínica e diagnóstico genético em pacientes com Deficiência Intelectual indeterminada, de uma instituição de internação crônica em Trindade-Goiás.”

Se você concordar em participar e autorizar a participação do seu (sua) filho(a), será examinado pela médica da equipe (Dr. Vinicius) e depois será coletado sangue. A coleta de sangue será realizada por uma biomédica da equipe capacitada para o procedimento. **Os riscos:** a coleta de sangue pode causar um pouco de desconforto físico e há possibilidade de aparecer uma mancha roxa (hematoma) na região. Caso apresente algum problema será imediatamente atendido por biomédicos capacitados. Para evitar constrangimentos durante a entrevista e/ou coleta de informações, será atendido

individualmente. O tempo para responder ao questionário e coleta do sangue para os exames solicitados será de aproximadamente trinta minutos.

Os resultados: serão entregues para os pais ou responsáveis e uma cópia de cada exame será arquivada no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da UFG. Os resultados serão divulgados em palestras dirigidas ao público participante, relatórios parciais e finais, apresentação em congressos e artigos científicos.

Garantia de sigilo e privacidade: seus dados serão identificados apenas por códigos e as informações obtidas na triagem do estudo, serão guardadas sob sigilo e poderão ser publicadas em relatórios científicos sem a identificação pessoal. Os questionários serão armazenados em pastas de acesso exclusivo da pesquisadora responsável e será mantido em arquivo sob a responsabilidade da coordenadora da pesquisa, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12 e orientações do CONEP.

A sua participação é voluntária. **Não haverá qualquer valor monetário ou gratificações** por ter participado da pesquisa e poderá em qualquer momento deixar a pesquisa sem penalidades ou perda dos benefícios recebidos. Ficará com você uma cópia deste Termo com os telefones dos investigadores, que esclarecerão qualquer dúvida que vier a ocorrer.

Sua participação é voluntária e muito importante para a execução da pesquisa. Ninguém saberá que seu (sua) filho(a) está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos as informações obtidas a estranhos e não identificaremos o nome do (a) seu (sua) filho(a) em hipótese alguma. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar da pesquisadora responsável informações sobre a participação de seu (sua) filho(a) e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito por meio dos telefones de contato da pesquisadora. A participação de seu (sua) filho(a) consistirá em responder um questionário e seu (sua) filho (a) será examinado, medido sua altura e peso, e faremos a coleta de sangue para exames de genética. As amostras de sangue serão obtidas por coleta na veia, feito com material estéril descartável e de uso individual. Caso concorde em participar desta pesquisa seu (sua) filho(a) será beneficiado com exames gratuitos. Desta forma, pretendemos auxiliar no diagnóstico das causas genéticas da Deficiência Intelectual.

DECLARO que a participação de meu (minha) filho(a) é isenta de despesas.

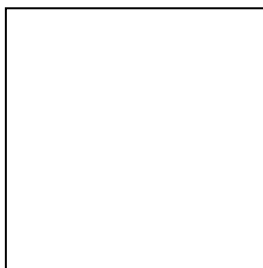
DECLARO que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo que meu (minha) filho(a) participe voluntariamente deste estudo, sem quaisquer penalidades ou qualquer prejuízo.

Eu, _____ abaixo assinado, documento de identidade nº _____ responsável pelo _____ aluno(a) _____, autorizo sua participação na pesquisa.

Fui devidamente informado(a) e esclarecido (a) sobre a pesquisa e os procedimentos envolvidos. Garantiram-me que posso retirar meu consentimento a qualquer momento. No caso de novas pesquisas propostas com os dados coletados, serei informado e permitirei ou não sobre o uso do material biológico. Em qualquer momento posso retirar o consentimento e deixar de participar desta pesquisa, sem qualquer prejuízo.

Goiânia, ____/____/____.

Assinatura do responsável pelo paciente: _____



Sujeito da pesquisa

Impressão digital

Agradecemos sua valiosa colaboração.

Atenciosamente,

Msc. Vinicius Montenegro Torres

Responsável pela pesquisa

Anexo 3 - Ficha de avaliação clínicaNúmero do paciente:**FICHA DE ANAMNESE****1. Identificação:**

Nome: _____ Nasc.: ____/____/____
 Local de nasc.: _____ Data de hoje: ____/____/____
 Mãe: _____ Nasc.: ____/____/____
 Profissão: _____ Escolaridade: _____
 Pai: _____ Nasc.: ____/____/____
 Profissão: _____ Escolaridade: _____

Telefones de contato:

Data de internação na instituição:

2. Dados gestacionais e antecedentes maternos

Pré-natal: Nº de consultas: _____ Duração da gravidez: _____

G/P/A

Complicações na gravidez () DHEG Hemorragia () Processo febril () Edema
 () Convulsões () Polidrâmnio () Oligodrâmnio ()

Obs.:

Enfermidades agudas/crônicas:

Fatores físicos/químicos: _____

3. Parto

Normal () Cesariana () Fórceps () Hospital: _____

Hospitalar () Domiciliar () Outro () Especificar _____

Obs.: _____

4. Condições do RN

Peso: _____ Comprimento: _____ PC: _____ PT: _____

APGAR: ____/____ Choro: _____ Cianose: _____ Sucção:

_____ Tônus: _____

Icterícia () Fototerapia () Exsanguinotransfusão ()

Permanência na maternidade: _____ dias Febre: _____ Convulsões: _____

Obs.: _____

5. Evolução

Firmou cabeça:

Sorriso social:

Sentou com apoio:

Sentou sem apoio:

Andou:

1^{as} palavras:

Frases:

Controle vesical:

Anos de escolaridade:

Tipo de escola:

6. Antecedentes pessoais**7. Antecedentes Familiares**

Deficiência Intelectual:

Recorrência familiar de doença semelhante:

Caso de malformação na família:

Recorrência familiar de alguma outra doença:

Consanguinidade entre os pais? () Tipo:

8. Exame Físico**Biometria**

Estatura: m

Peso: Kg

IMC: (Peso normal)

PC: cm (ROLLINS: P)

DII: mm

DIE: mm

Exame físico geral:

Exame morfológico:

- 1) Crânio e face:
- 2) Pescoço, tórax e abdome:
- 3) Membros:
- 4) Pele e anexos:

Resumo dos Achados:**Exames Solicitados e Resultados de Exames:**

- 1) Tomografia de crânio:
- 2) USG de abdome total:
- 3) Radiografia de tórax:
- 4) Hemograma:
- 5) TGO/TGP:
- 6) Ureia e creatinina:
- 7) Eletrólitos (Na, K, Ca, Mg, Cl e P):
- 8) EAS:
- 9) TSH:
- 10) Glicemia de jejum:

Anexo 4 - Quadro com as informações dos pacientes do estudo sobre o sexo, procedência, idade, gravidade da DI, associação com TEA, familiares acometidos e as avaliações antropométricas.

Nº	Sexo	UF	IDADE	DI	DI familiar	PC	Peso	Estatura	IMC
1	F	GO	21.3	G + TEA 3	Mãe	$10 < P < 90$	Adequado	BE	Adequado
2	M	DF	16.0	P	Irmão	$10 < P < 90$	BP	Adequada	Baixo
3	F	BA	24.5	M	Mãe, tia e primo	$10 < P < 90$	Obesidade	Adequada	Elevado
4	M	DF	18.4	P	Mãe e tia avó	$P < 3$	BP	BE	Baixo
5	M	GO	23.2	P	Não	$P < 3$	BP	BE	Baixo
6	F	GO	3.5	P	Tia avó e tio	$3 < P < 10$	BP	BE limítrofe	Baixo
7	M	GO	10.9	G	Não	$P < 3$	BP	Adequada	Baixo
8	F	GO	17.5	M	Não	$10 < P < 90$	Adequado	BE	Adequado
9	F	GO	19.8	M	Mãe, tia e irmão	$10 < P < 90$	Obesidade	Adequada	Elevado
10	M	GO	11.8	G + TEA atípico	Mãe	$10 < P < 90$	Adequado	Adequada	Adequado
11	F	BA	21.2	P	Vários familiares	$3 < P < 10$	BP	BE	Baixo
12	M	GO	22.5	P	Não	$P < 3$	BP	BE	Baixo
13	M	PA	18.7	P + TEA 3	Irmã	$10 < P < 90$	BP	BE	Adequado
14	F	GO	18.4	P	Não	$P < 3$	BP	BE	Adequado

continua

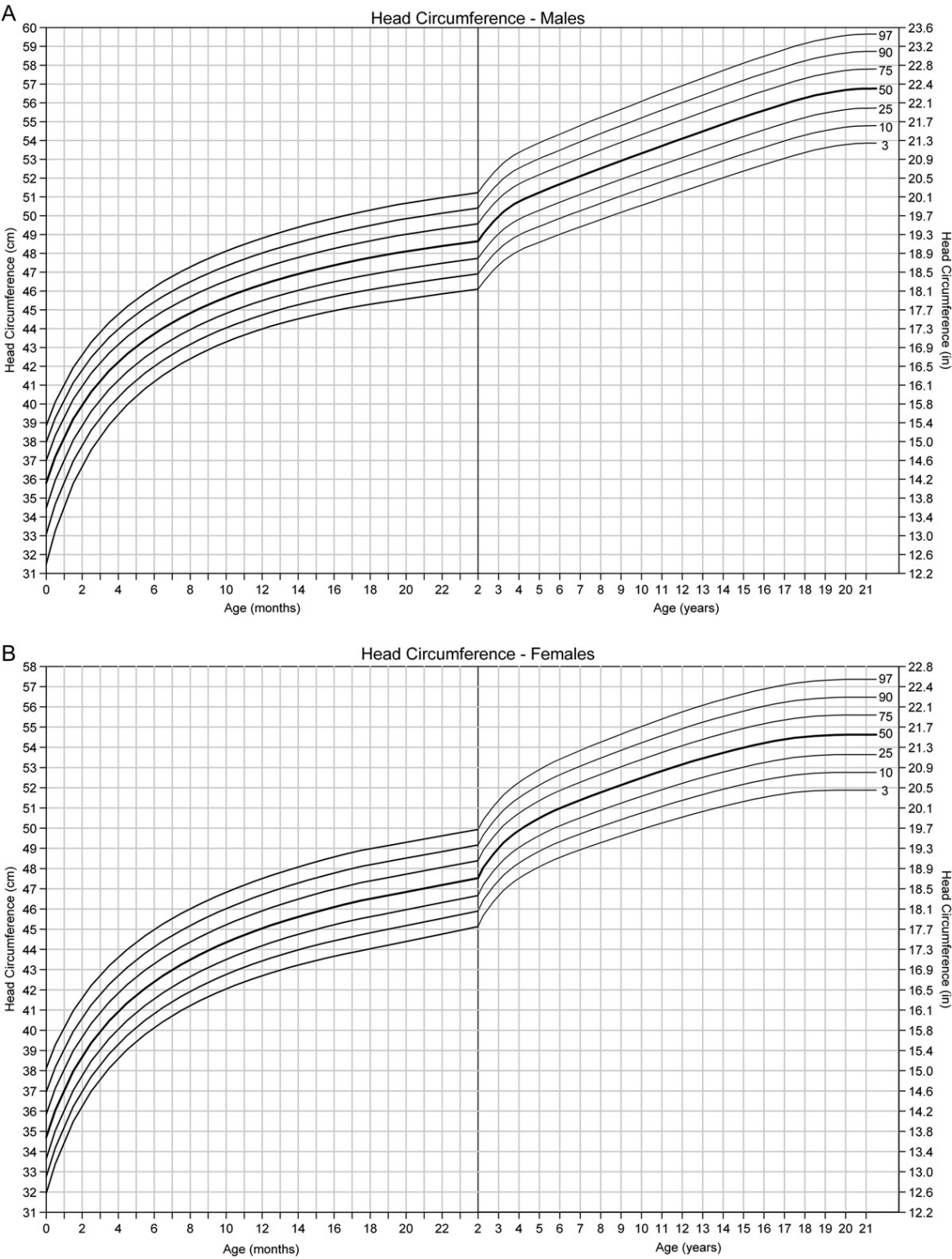
Anexo 4 - Quadro com as informações dos pacientes do estudo sobre o sexo, a procedência, a idade, a gravidade da DI, a associação com TEA, os familiares acometidos e as avaliações antropométricas.

continuação

Nº	Sexo	UF	IDADE	DI	DI familiar	PC	Peso	Estatura	IMC
15	M	GO	16.1	P + TEA 3	Tia	3 < P < 10	BP	BE limítrofe	Baixo
16	F	MG	10.8	G	Não	P < 3	BP	BE	Baixo
17	F	GO	22.5	M	ND	P < 3	Obesidade	BE	Elevado
18	M	GO	24.9	P	Tio e sobrinho	P < 3	BP	BE	Baixo
19	F	MA	14.1	G	ND	P < 3	Adequado	BE limítrofe	Adequado
20	F	GO	14.8	P	Tio materno	P < 3	BP	BE	Baixo
21	F	GO	23.8	M	Irmã	P < 3	Adequado	Adequada	Adequado
22	M	GO	10.9	G	Mãe, tia e prima	10 < P < 90	Adequado	Adequada	Adequado
23	M	GO	9.5	G + TEA	Mãe e pai	10 < P < 90	Adequado	Adequada	Adequado
24	M	GO	13.1	P	Primos	3 < P < 10	BP	Adequada	Baixo
25	M	GO	16.7	P	Avó e tio avô	P < 3	BP	BE	Adequado
26	M	GO	8.0	G	ND	P < 3	BP	BE limítrofe	Baixo
27	M	DF	21.8	G	ND	10 < P < 90	Adequado	BE	Adequado

*BP: baixo peso, **BE: baixa estatura, DI: Deficiência Intelectual, M: moderada, G: Grave, P: Profunda e ND: dados não disponíveis

Anexo 5 - Curvas de perímetro craniano propostas por Rollins e colaboradores (2010).



Anexo 6 - Sumário das manifestações clínicas da casuística do estudo.

Nº	Sinais e sintomas
1	Transtorno do Espectro Autista + Epilepsia
2	Paraplegia flácida de membro inferior Deficiência Auditiva Epilepsia (Síndrome de Lennox-Gastaut) Dismorfismos faciais Pé torto congênito
3	Fácies Cushingóide Dismorfismos faciais (base nasal larga)
4	Microcefalia e desproporção craniofacial Paralisia cerebral tetraplégica espástica Epilepsia de difícil controle
5	Microcefalia e desproporção craniofacial Paralisia cerebral tetraplégica espástica Epilepsia de difícil controle
6	Malformação de SNC Paralisia cerebral tetraplégica espástica Epilepsia Deficiência Auditiva e visual
7	Malformação de SNC + Dismorfismos faciais Paralisia cerebral tetraplégica espástica Epilepsia de difícil controle

Nº	Sinais e sintomas
8	Face sindrômica (baixa implantação da orelha, hipertelorismo, ponte nasal baixa e base nasal ampla, boca grande, lábios volumosos, defeitos dentários, palato alto e ogival. Pescoço e tórax curto, cifoscoliose torácica e lordose lombar. Pés planos, tornozelo valgo, hipoplasia/displasia de 4º pododáctilo e hiperextensibilidade articular de joelhos. Hipertricosose Hipotonia generalizada
9	Sem sintomas associados a DI
10	Transtorno do Espectro Autista
11	Malformação de SNC + Dismorfismos faciais Paralisia cerebral tetraplégica espástica Deficiência Auditiva Deficiência Visual Epilepsia
12	Malformação de SNC Paralisia cerebral tetraplégica espástica
13	Transtorno do Espectro Autista Face sindrômica: baixa implantação da orelha, hipertelorismo, base nasal ampla e lábio superior evertido. Diabetes mellitus congênita e Paralisia facial bilateral

continua

Anexo 6 - Sumário das manifestações clínicas da casuística do estudo.

continuação

Nº	Sinais e sintomas
14	Malformação de SNC Paralisia cerebral tetraplégica espástica Deficiência Auditiva e visual Epilepsia
15	Transtorno do Espectro Autista
16	Malformação de SNC Paraplegia flácida de membro inferior Deficiência Auditiva e Epilepsia Malformação renal Deformidade de coluna e fusão de costelas.
17	Malformação de SNC + Dismorfismos faciais Paraplegia flácida de membro inferior Epilepsia
18	Malformação de SNC Paralisia cerebral tetraplégica espástica Deficiência Auditiva e visual Epilepsia de difícil controle
19	Malformação de SNC Deficiência Auditiva e visual Panhipopituitarismo

DI: Deficiência Intelectual

SNC: Sistema Nervoso Central

Nº	Sinais e sintomas
20	Malformação de SNC + Dismorfismos faciais Paralisia cerebral tetraplégica espástica Deficiência Auditiva e visual Epilepsia
21	Microcefalia e desproporção craniofacial
22	Face sindrômica: alongada, fronte aumentada, macroglossia, palato estreito, orelhas de abano e lábios proeminentes. Membros: pés planos e tornozelo valgo bilateral.
23	Transtorno do Espectro Autista
24	Malformação de SNC Paralisia cerebral tetraplégica espástica Epilepsia de difícil controle
25	Microcefalia e desproporção craniofacial Deficiência Visual Ataxia e Epilepsia
26	Malformação de SNC Paraplegia flácida de membro inferior Epilepsia
27	Malformação de SNC Paralisia cerebral tetraplégica espástica Epilepsia de difícil controle

