# Identificação da etiologia da deficiência intelectual esporádica por sequenciamento de exomas de afetados e seus pais

Elucidation of sporadic Intellectual disability etiology by exome sequencing of affected individual and their parents

São Paulo

2016

# THAISE NAYANE RIBEIRO CARNEIRO

# Identificação da etiologia da deficiência intelectual esporádica por sequenciamento de exomas de afetados e seus pais

Elucidation of sporadic Intellectual disability etiology by exome sequencing of affected individual and their parents

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Biologia (Genética).

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Carla Rosenberg

São Paulo

2016

## AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## Ficha catalográfica

### CARNEIRO, THAISE N. R.

Identificação da etiologia da deficiência intelectual esporádica por sequenciamento de exomas de afetados e seus pais.

170 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de genética e Biologia evolutiva

1. Deficiência intelectual 2. Exoma 3. Sequenciamento de Nova Geração I.

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

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaise Nayane Ribeiro Carneiro

# Identificação da etiologia da deficiência intelectual esporádica por sequenciamento de exomas de afetados e seus pais

Dissertação apresentada ao departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração Biologia/Genética.

Orientadora: Carla Rosenberg

Aprovado em:

Banca Examinadora

Dr.

Instituição:

Dr.

Instituição:

Dr.

Instituição:

Dr. <sup>a</sup> Carla Rosenberg

(presidente)

Este trabalho foi realizado com os auxílios financeiros da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) concedidos à aluna (Bolsa CAPES-DS nível mestrado – 2014/1413815), à orientadora (projeto temático – processo 2009/00898-1, projeto CEPID 2013/08028-1), e ao departamento (programa CAPES-PROEX).

Dedico este trabalho: À minha família; Aos pacientes que motivaram esse estudo.

#### AGRADECIMENTOS

O período que passei em São Paulo para a realização do mestrado, foi uma época de grandes desafios, pessoais e acadêmicos; cresci muito nesse período que passei por aqui, e aprendi muito nessa universidade. Esse trabalho só foi realizado devido à colaboração de diversas pessoas, a todos meu sincero agradecimento, em especial àqueles citados abaixo.

Aos pacientes e seus responsáveis, agradeço pela confiança e participação no projeto, o contato que tive com alguns de vocês em consultas médicas, me fez relembrar o verdadeiro motivo de eu ter escolhido o caminho da pesquisa, e me motivou a finalizar o projeto e continuar meu caminho.

Palavras são poucas para expressar meus agradecimentos à Dr<sup>a</sup> Carla Rosenberg; que humildemente respondeu um e-mail de uma aluna do Rio Grande do Norte, e aceitou me receber no seu laboratório em São Paulo para fazer pós-graduação. Cheguei crua e insegura, mas a sua paciência e ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento como aluna e para a realização desse projeto; sou muito grata por tudo.

À Silvia Costa que me ensinou tantas coisas, e que foi fundamental para a realização da metodologia do projeto; muito obrigada, esse trabalho não teria sido realizado sem você. À Dr. <sup>a</sup> Ana Krepischi pela contribuição, acompanhamento e ensinamentos, obrigada.

Aos médicos que fizeram avaliação clínica dos pacientes desse trabalho, Dr. Eduardo Fusão, Dr. <sup>a</sup> Tânia Vertemati, Dr. <sup>a</sup> Liane Giuliani, Dr. Marcial Galera, Dr. Juan Llerena Jr., Dr. <sup>a</sup> Fabíola Monteiro, Dr. Eduardo Perrone, Dr. <sup>a</sup> Angela Morgante, Dr. Fernando Kok; e em especial aos Dr. Paulo Otto e Dr. <sup>a</sup> Débora Bertola, que me permitiram acompanhar as consultas, uma oportunidade imensurável, meu muito obrigada.

À Ligia, pelos ensinamentos compartilhados, pelas conversas e palavras. Muito obrigada, vou sempre lembrar de você com carinho onde quer que esteja.

Aos meus colegas de laboratório, e aos meus amigos que partilharam momentos de felicidade, angústia, e claro muitas idas ao bandejão! Alex, Juliana, Renan, Leandro, Daiane.... Obrigada pelas risadas!

Ao departamento de Genética e Biologia Evolutiva (IB-USP) e ao Centro de Estudos do Genoma Humano pelo apoio e infraestrutura.

Aos professores maravilhosos que tive durante meu mestrado, que me ensinaram mais do que eu poderia imaginar, muito obrigada!

Aos meus familiares, que me ajudaram a passar por momentos difíceis aqui, em especial à minha tia Albinha, com que eu sempre posso contar; à minha querida irmã, minha companheira de vida, minha melhor amiga, obrigada pelas conversas; e ao meu avô, que sempre se importou e ajudou minha família, a vida nos separou em março, e apesar dele não está mais aqui para ver a conclusão de mais essa etapa, quero deixar registrado o meu agradecimento, sinto sua falta.

Aos meus pais, que embarcaram comigo nessa aventura, e fizeram tudo para dar certo e para que eu fosse feliz. Eu amo demais vocês, e sem nossos telefonemas para matar a saudade, e o apoio imensurável que vocês me dão independente do que eu decida fazer, eu não teria conseguido!

#### RESUMO

CARNEIRO, T. N. R. Identificação da etiologia da deficiência intelectual esporádica por sequenciamento de exomas de afetados e seus pais. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Deficiência intelectual (DI), associada ou não a outras alterações congênitas, é a razão mais frequente de procura por aconselhamento genético pelas famílias. Até alguns anos atrás, a realização de cariótipo, triagem para doenças metabólicas e fra(x) elucidavam apenas ~40% dos casos de pacientes com DI idiopática. Com o surgimento de arrays genômicos, as causas moleculares por trás de outros ~20% dos quadros de DI foram elucidadas; porém, mesmo com esse avanço, muitos pacientes ainda permanecem sem causa molecular clara que justifique o fenótipo. O sequenciamento do exoma (WES) é hoje um dos recursos disponíveis para o diagnóstico e possível elucidação das causas genéticas por trás da deficiência intelectual idiopática, abrindo caminho também à identificação de novos genes. O presente trabalho realizou o sequenciamento de exoma de 8 probandos que tinham em comum a deficiência intelectual esporádica, acompanhada ou não de outros sinais clínicos, e de seus genitores não afetados (trios). Esses pacientes foram previamente triados para a síndrome do X frágil, e submetidos a exame de array CGH para investigação de perdas e ganhos de segmentos cromossômicos, ambos com resultados negativos. O objetivo desse estudo foi detectar alterações e possivelmente novos genes associados com a DI, usando pipelines de padrões de herança mendeliano. Treze alterações em 9 genes foram detectadas por sequenciamento de exoma e confirmadas por sequenciamento Sanger: 8 mutações bialélicas em genes recessivos (TBC1D24, ADAMTSL2, NALCN, VPS13B), uma ligada ao X (MID1), e 4 alterações de novo (RYR2, GABBR2, CDK13, DDX3X); 5 dessas alterações ainda não haviam sido descritas nos bancos de dados consultados, caracterizando mutações novas. Dos 8 trios, em 5 identificamos alterações moleculares provavelmente responsáveis pelos quadros apresentados; dois desses casos foram em genes recessivos (mutações homozigotas ou em

heterozigose composta) e potencialmente teriam sido detectados mesmo se apenas os probandos houvessem sido sequenciados. Para as alterações em heterozigose, porém, a avaliação dos genitores e constatação de status de novo da mutação foram importantes para avaliar o impacto da variante. Esse trabalho resultou em uma taxa de diagnóstico de 62,5%; mesmo considerando o pequeno tamanho da amostra, esse valor está bem acima dos 15-30% relatados na literatura quando essa metodologia é utilizada para o estudo de casos esporádicos de DI. Em dois casos, mutações foram identificadas em genes que só foram descritos como mutados recentemente e que ainda não são considerados genes de deficiência intelectual no OMIM: o gene CDK13 foi descrito como mutado em pacientes de uma única coorte com malformação cardíaca congênita (sindrômica ou não), porém sua contribuição para coortes de DI ainda não foi investigada. O gene GABBR2, identificado mutado em heterozigose em um dos nossos pacientes, já havia sido considerado um candidato potencial para DI, mas apenas 2 trabalhos detectaram mutações nesse gene entre pacientes com DI e epilepsia. Os resultados aqui apresentados substanciam o papel desses genes como implicados na DI sindrômica de herança autossômica dominante, e devem contribuir para serem considerados genes OMIM de deficiência intelectual.

Palavras-chave: Deficiência Intelectual. Exoma. Sequenciamento de nova geração.

#### ABSTRACT

CARNEIRO, T. N. R. Elucidation of sporadic Intellectual disability etiology by exome sequencing of affected individual and their parents. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Intellectual disability (ID), associated or not with other congenital abnormalities, is the most frequent reason for families to seek genetic counseling. Until some years ago, karyotyping, metabolic disease and FRAXA screening elucidated only  $\sim$ 40% of patients with idiopathic ID. Importantly, with the introduction of genomic arrays, the molecular cause behind a further ~ 20% of ID cases was determined; however, despite this improvement, many patients are still not provided with a clear molecular explanation and cause for their phenotype. Nowadays, whole exome sequencing (WES) is one of the methods available for diagnosis and a further means of possible elucidation of the genetic causes of idiopathic intellectual disability; in many cases this method also allows identification of genes that have not been previously related to ID. In the present project, we sequenced the exome (WES) of 8 sporadic patients that all had ID, with or without other clinical signs, and their unaffected parents (trios); these patients had been previously screened for fragile X syndrome and for losses and gains of chromosomal segments by array CGH, both with negative results. The objective of this study was to detect mutations and possibly new genes associated with ID, using pipelines for Mendelian inheritance patterns. Thirteen mutations in 9candidate genes were detected by exome sequencing and confirmed by Sanger sequencing, among them 8 biallelic mutations in autossomal recessive genes (TBC1D24, ADAMTSL2, NALCN, VPS13B), one mutation in an X-linked gene (MID1), and 4 de novo alterations (RYR2, GABBR2, CDK13, DDX3X); 5 of these mutations had not been described in the databases consulted characterizing new variants. Of the 8 trios, we obtained a probable diagnosis of the molecular alteration responsible for the presented phenotypes in 5. Two of these cases were in recessive genes (homozygous mutations or compound heterozygous), and the mutations would probably have been detected even if only the probands

had been sequenced. However, for the heterozygous mutations, the assessment of the parents and the confirmation of the *de novo* status of the mutation was important to evaluate the impact of the variant. This work resulted in a diagnosis rate of 62.5%; even considering the small sample size, this value is well above the average of 15-30% reported in the literature when the methodology used for the study of ID sporadic cases is considered. In two cases, mutations were detected in genes only recently described as mutated and which are not considered yet as OMIM ID genes. The *CDK13* gene had already been described as mutated in a single cohort of patients with syndromic congenital heart defects, but its contribution to ID cohorts has not been established. The *GABBR2* gene, where a heterozygous mutation was identified in the patient, had already been considered a potential candidate for ID; there are only 2 studies that detected mutations in this gene among patients with ID and epilepsy. This contribution may pave the way to establishing *GABBR2* and *CDK13* as causations of ID and acceptance by OMIM.

Keywords: Intellectual disability. Exome. Next generation sequencing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estratégias para análise de exoma, a) pacientes não relacionados com o mesmo quadro clínico, b) análise de trio, c) análise familiar. Fonte: figura adaptada de Topper et al. 2001 .....54 Figura 2 - Análise do DNA fragmentado usando o Bioanalyzer. O eletroferograma mostra a distribuição almejada com um pico entre 120 e 150 pb ......67 Figura 3 - Primeira avaliação da amostra pelo *Bioanalyzer* realizada em DNA de um paciente da coorte, mostrando o pico entre 120 e 150 pb, como exigido pelo Figura 4- Análise do DNA fragmentado usando o *Bioanalyzer*. O eletroferograma mostra a distribuição esperada, com pico entre 225 e 275 pb ......68 Figura 5 - Segunda avaliação de amostra pelo Bioanalyzer, realizada em DNA de um paciente da coorte ......68 Figura 6 - Análise do DNA fragmentado usando o Bioanalyzer. O eletroferograma mostra uma distribuição com pico entre 250 e 350 pb ......69 Figura 7- Terceira avaliação de amostra pelo Bioanalyzer realizada em DNA de um paciente da coorte ......69 Figura 8 - Fluxograma da metodologia utilizada nesse projeto ......71 Figura 9 - Fluxograma dos passos realizados para filtrar e analisar as variantes Figura 10 - Qualidade do arquivo BAM de uma amostra (PCGH856) submetido a fragmentação mecânica. A) qualidade das bases, B) nível de duplicação, C) Proporção de bases ......80 Figura 11 - Qualidade do arquivo BAM de uma amostra (PCGH319) submetido a fragmentação enzimática. A) qualidade das bases, B) nível de duplicação, C)  Figura 14 - Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 1 contendo a variante do gene *RYR2* (1:237957254) detectada de novo no paciente PCGH 948; a) paciente, b) mãe, c) pai ......90

Figura 15 - Confirmação da variante do gene *RYR2* por sequenciamento Sanger no trio PCGH948.a) paciente, b) mãe, c) pai. O sequenciamento mostra a presença da guanina nos pais, e o paciente portando os nucleotídeos A e G, caracterizando heterozigose, de novo ......91

Figura 16 - Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo X contendo a variante do gene *MID1* (X:10535359) detectada em hemizigose no paciente PCGH 948 e em heterozigose em sua mãe; a) paciente, b) mãe, c) pai ......91

Figura 17 - Confirmação da variante do gene *MID1* por sequenciamento Sanger no trio PCGH948; a) paciente, b) mãe, c) pai. Mostrando ambos os nucleotídeos na mãe (C e T), e apenas o nucleotídeo alterado T no paciente.......92

 Figura 28 - Imagens (arquivos BAM) das regiões do cromossomo 13 que contêm as variantes no gene *NALCN* detectadas em heterozigose composta na paciente PCGH1031: a) paciente; b) mãe; c) pai ......104

A. Variante C/T (13:101717778), herdada do pai104
B. Variante C/A (13:101721179), herdada da mãe105
Figura 29 - Confirmação por sequenciamento Sanger das variantes no gene NALCN presentes em heterozigose composta na paciente PCGH1031; a)
paciente, b) mãe, c) pai106
<ul> <li>A. Variante C/T (13:101717778), herdada do pai106</li> <li>B. Variante C/A (13:101721179), herdada da mãe107</li> </ul>
Figura 30 - Imagem (arquivo BAM) das regiões do cromossomo 8 que contêm as variantes no gene <i>VPS13B</i> detectadas em heterozigose composta na paciente PCGH 1031; a) paciente; b) mãe; c) pai108
<ul> <li>A. Variante C/T (8:100654570), herdada do pai108</li> <li>B. Variante C/G (8:100865871), herdada da mãe108</li> </ul>
Figura 31 - Confirmação por sequenciamento Sanger de presença de heterozigose composta do gene <i>VPS13B</i> na paciente PCGH1031; a) paciente, b) mãe, c) pai
A. Variante C/T (8:100654570), herdada do pai109
B. Variante C/G (8:100865871), herdada da mãe110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de alguns parâmetros das plataformas de NGS       40
Tabela 2 - Comparação entre quatro principais kits comerciais disponíveis parasequenciamento de exoma
Tabela 3 - Bancos de dados utilizados frequentemente para anotação e análise de variantes detectadas através do sequenciamento total ou parcial do genoma humano44
Tabela 4 - Algumas alterações cromossômicas detectadas por array-CGHassociadas a deficiência intelectual
Tabela 5 - Alguns genes que foram associados a deficiência intelectual antes da era do NGS50
Tabela 6 - Estudos com sequenciamento do exoma em pacientes com DI semdiagnóstico molecular
Tabela 7 - Sinais clínicos presentes nos pacientes participantes da pesquisa63
Tabela 8 - Bancos de dados utilizados para auxiliar na filtragem de variantes74
Tabela 9 - Variantes potencialmente causativas dos fenótipos dos pacientes         analisados       85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A Adenina
- AAIDD American Association on Intellectual and Developmental Disabilities
- ABI Applied Biosystems
- ABraOM Arquivo Brasileiro Online de Mutações
- ADID Deficiência intelectual autossômica dominante
- Ala Alanina
- Alt Alterado
- AMPc Monofosfato cíclico de adenosina
- Arg Arginina

ARID - Deficiência intelectual autossômica recessiva (*autossomal-recessive intelectual disability*)

- Asn Asparagina
- Asp Aspartato
- ATP Adenosina trifosfato
- BAC Cromossomos artificiais bacterianos
- BAM Binary Alignment Map
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool
- BR Amplo alcance (Broad-Range)
- BWA Burrows-Wheeler Aligner
- C Citosina
- Ca<sup>2+</sup> Cálcio
- CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CCDS The consensus coding sequence project

- CEFAP Centro de Facilidades para a Pesquisa
- CEGH Centro de Pesquisa do Genoma Humano
- CEPID Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão
- CGH Hibridização comparativa de genomas
- ChIP Imunoprecipitação de cromatina
- CIA Comunicação interatrial
- CIA OS Comunicação interatrial do tipo ostium secundum
- CDK Ciclina dependente de quinase
- CNV Variação no número de cópias (Copy number variation)
- Cm Centímetro
- CPVT Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
- DAVD Displasia arritmogênica do ventrículo direito
- dbSNP Single Nucleotide Polymorphism Database
- ddNTP Didesoxinucleotídeo fosfatado
- DEAD Proteínas com domínio de ATPase composta pelos aminoácidos D-E-
- A-D (ácido aspártico-ácido glutâmico-Alanina-ácido aspártico)

DI - Deficiência intelectual

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo fosfatado

DOOR - Surdez, Onicodistrofia, Osteodistrofia, e Deficiência intelectual (Deafness, Onychodystrophy, Osteodystrophy, and Developmental delay/ Intellectual disability).

Dr - Doutor

DsDNA - DNA dupla fita (Double strand DNA)

E3 - Ubiquitina ligase

- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPGP Epilepsy Phenome/ Genome Project
- Epi4k Gene Discovery in 4,000 genomes
- ESP6300SI-V2 Current Exome Variant Serve data
- EUA Estados Unidos da América
- EuroEPINOMIC European Science Foundation
- ExAC Exome Aggregation Consortium
- F Feminino
- FAPESP Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
- FISH Hibridização fluorescente in situ (Fluorescence in situ hybridization)
- Fra(X) X Frágil
- G Guanina
- GABA Ácido gama-aminobutírico
- GABA<sub>B</sub> Subtipo de receptor GABA
- Gb Gigabase
- H+ Íon de hidrogênio
- His Histidina
- HIV Vírus da imunodeficiência humana
- HS Alta sensibilidade (High sensitivity)
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IB-USP Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
- IHPRF1 Hypotonia, infantile, with psychomotor retardation and characteristic facies 1
- lle Isoleucina
- K<sup>+</sup> Potássio

- Kb Kilobase
- Kg Kilograma
- Leu Leucina
- LoF Perda de função (Loss of Funcion)
- M Masculino
- MAPP Multivariate Analysis of Protein Polymorphism
- Mb Megabase
- µg Micrograma
- MGI Mouse Genome Informatics
- ml Mililitro
- Na<sup>+</sup> Sódio
- NCBI National Center for Biotechnology Information
- ng Nanograma
- NGS Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing)
- NHLBI National Heart, Lung, and Blood Institute
- nM Nanomolar
- NS-ARID Deficiência Intelectual autossômica recessiva não sindrômica
- NS-XLID Deficiência intelectual não sindrômica ligada ao X
- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man
- OMS Organização Mundial da Saúde
- Pb pares de base
- PC Perímetro cefálico
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- pH Potencial hidrogeniônico

PhD-SNP - Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms

- Phe Fenilalanina
- PNS Pesquisa Nacional de saúde

PolyPhen - Polymorphism Phenotyping

POP7 - Polímero de alta performance

- QI Quociente de inteligência
- Ref Referência
- RefSeq The NCBI Reference Sequence
- RefSNP SNP referência
- RNA Ácido ribonucleico
- RNAm RNA mensageiro
- RNM Ressonância Magnética
- S-ARID Deficiência intelectual autossômica recessiva sindrômica
- SAM Sequence Alignment Map
- Ser Serina
- SIFT Sorting Intolerant From Tolerant
- SNP Polimorfismo de base única
- SNV Variação de base única
- SnRNA Pequeno RNA nuclear
- S-XLID Deficiência intelectual sindrômica ligada ao X
- T Timina
- TBC Tre2/Bub2/Cdc16
- Thr Treonina
- TLC TRAM/LAG1/CLN8

TMAP - Torrent Mapping Alignment Program

Tyr - Tirosina

- UCSC University of California, Santa Cruz
- UTR Região não traduzida (untranslated region)
- USP Universidade de São Paulo
- UV Radiação ultravioleta
- Val Valina
- VCF Variant Call Format
- VEP Variant Effect Predictor
- VT Taquicardia ventricular
- WAIS Wechsler Intelligence Scale for Adults
- WISC Wechsler Intelligence Scale for Children
- WGS Sequenciamento completo do genoma (whole genome sequencing)
- WES Sequenciamento total do exoma (whole exome sequencing)
- XLID Deficiência intelectual ligada ao X (X-linked intelectual disability)

# SUMÁRIO

Capítulo I: Introdução	26
I.1. Deficiência intelectual	27
I.2. Da citogenética clássica aos arrays genômicos	30
I.3. Sequenciamento: de Sanger a Next Generation Sequence	34
I.3.1 Plataformas de NGS	36
I.3.2 Estratégias para o uso do NGS	40
I.3.3 Bioinformática e NGS	43
I.4. A genética da deficiência intelectual	45
I.4.1 Alterações cromossômicas associadas a DI	46
I.4.2 DI monogênica associada ao cromossomo X	48
I.4.3 Di monogênica associada a autossomos	49
I.5 WES e deficiência intelectual	52
I.5.1 Sequenciamento de exoma e mutações de novo	55
I.5.2 Sequenciamento de exoma e alterações autossômicas	
recessivas	56
I.5.3 Sequenciamento de exoma e alterações no cromossomo X	56
I.5.4 Sumário dos achados de WES para elucidar a etiologia da DI	57
Capítulo II: Objetivos	60
II.1. Objetivos gerais	61
II. 2. Objetivos específicos	61
Capítulo III: Casuística	62
III.1. Pacientes	63
Capítulo IV: Metodologia	65

IV.1. Construção de bibliotecas e sequenciamento dos exomas66
IV.2. Análise do sequenciamento de exomas71
IV.3. Sequenciamento Sanger76
Capítulo V: Resultados78
V.1. Avaliação da qualidade dos resultados obtidos no sequenciamento de nova geração dos exomas
V.2. Resultados obtidos para cada paciente86
V.2.1 PCGH85686
V.2.2 PCGH94889
V.2.3 PCGH31994
V.2.4 PCGH58497
V.2.5 PCGH145499
V.2.6 PCGH1005101
V.2.7 PCGH1031103
V.2.8 PCGH289110
Capítulo VI: Discussão112
VI.1 Pacientes nos quais foram detectadas mutações potencialmente causativas
VI.1.1 PCGH856117
VI.1.2 PCGH948119
VI.1.3 PCGH584123
VI.1.4 PCGH1454125
VI.1.5 PCGH1005127
VI.1.6 PCGH1031129
Capítulo VII: Conclusões

VII.1. Qualidade necessária para o uso das metodologias de WES e
sequenciamento Sanger para diagnóstico134
VII.2. Taxa de diagnóstico134
VII.3. Mutações novas135
VII.4. Evidências que confirmam o papel na DI de genes ainda pouco caracterizados
Referências137
Anexos167
Anexo 1: Termo de consentimento168
Biografia169

Capítulo I: Introdução

#### I.1. Deficiência Intelectual

A deficiência intelectual (DI) é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma redução na capacidade de compreenção de informações novas ou complexas e no aprendizado e execução de novas habilidades. Essas características se manifestam antes da vida adulta com efeito duradouro durante o desenvolvimento e levam à redução da autonomia e da interação social.

Segundo a American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD - https://aaidd.org/), a deficiência intelectual consiste em inaptidão caracterizada por limitações significativas tanto no funcionamento intelectual como no comportamento adaptativo, abrangendo várias habilidades sociais e práticas diárias. Essa deficiência se evidencia durante o período de desenvolvimento, antes dos 18 anos de idade.

No Brasil, o decreto 5296/04 que regulamenta as leis federais 10.048 e 10.098/2000 (http://www.oabsp.org.br/comissoes2010/defesa-direitos-pessoasespeciais/cartilhas), define a deficiência intelectual como funcionamento intelectual significativamente inferior à média apresentada pela população, com manifestação antes dos 18 anos e limitações associadas a duas ou mais áreas de habilidades adaptativas, tais como: comunicação, cuidado pessoal, habilidades sociais, utilização de recursos da comunidade, saúde, segurança, habilidades acadêmicas, lazer e trabalho. A deficiência intelectual impacta não apenas o portador, mas tem reflexos também nos familiares e na comunidade.

A DI é uma condição clínica complexa e heterogênea que pode resultar de causas genéticas, ambientais ou uma combinação, e pode ser classificada como sindrômica ou isolada. Na deficiência intelectual isolada, o paciente apresenta unicamente a DI, sem outros sinais clínicos associados (GUSTAVSON, 2005; HARBOUR; MAULIK, 2010), enquanto na DI sindrômica, o paciente possui outros sinais clínicos além da deficiência intelectual, constituindo um quadro clínico complexo; nos casos de DI sindrômica, os pacientes apresentam malformações ou dismorfias, adicionando outros fatores complicantes no cuidado para com o paciente.

Para diagnosticar a deficiência intelectual e sua severidade, testes de QI como o Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC) e Wechsler Intelligence Scale

for Adults (WAIS) são aplicados para crianças e adultos, respectivamente. O desempenho verbal e motor são avaliados separadamente e posteriormente são combinados em uma pontuação total; a média de QI da população geral é definida como 100 e apresenta desvio padrão de 15; indivíduos com um QI de 70 ou menor (2 desvios padrão abaixo da média) são classificados como deficientes intelectuais (LEONARD; WEN, 2002).

Convencionalmente, a DI é classificada de acordo com o QI dos indivíduos em leve (entre 70 e 50), moderada (50 e 35), grave (entre 35 e 20) e profunda (menor que 20). A DI leve é muitas vezes diagnosticada tardiamente, ou nem sequer é diagnosticada, já que na maioria dos casos ela está presente na forma isolada ou associada a elementos dismórficos que podem passar despercebidos durante a avaliação clínica. Pacientes com esse grau de alteração apresentam dificuldades no processo de aprendizagem, embora muitos dos adultos consigam trabalhar e adquirir relativa independência pessoal e social. Na forma moderada de DI, o paciente tem dificuldades mais significativas no processo de aprendizagem, noções básicas de leitura e escrita não são frequentemente adquiridas, mesmo considerando que o paciente possa desenvolver certo grau de independência em atividades diárias. Pacientes com DI grave geralmente apresentam uma completa dependência para a realização de ações diárias; e a DI profunda possui como característica uma redução grave do potencial de comunicação e de mobilidade (SCHALOCK et al., 2010). A DI, distribuída em leve, moderada, grave e profunda, afeta 85%, 10%, 4%, e 2% respectivamente dos pacientes (LEONARD; WEN, 2002; DURKIN, 2002; GUSTAVSON, 2005; HARRIS, 2006; KING et al., 2009).

A deficiência intelectual é mais prevalente nos países com menores índices socioeconômicos e sua incidência varia de um país para outro. Uma maior incidência de DI é encontrada em países com renda baixa ou moderada e essa maior prevalência pode ser explicada, em parte, por um menor grau de escolaridade, saúde pública precária e também, dependendo da cultura, um maior índice de consanguinidade parental. Estudos anteriores, baseados sobretudo em populações americanas e europeias, reportaram uma prevalência de deficiência intelectual de 1-3%. Critério de diagnóstico, severidade do quadro clínico, gênero e idade do paciente, e grupo de indivíduos estudados também

interferem na estimativa de DI. Vários estudos já demonstraram que a prevalência de DI é maior em homens, 1,4 vezes maior que em mulheres em casos de DI grave e 1,9 em quadros de DI moderada (LEONARD; WEN, 2002; DURKIN, 2002; GUSTAVSON, 2005; HARRIS, 2006; KING et al., 2009).

A DI pode ser causada por diversos fatores, classificados em pré-natais, perinatais e pós-natais. Os fatores pré-natais são aqueles que ocorrem entre o momento da concepção até o parto, tais como: alterações genéticas; uso pela mãe de tabaco, álcool, drogas ilícitas e medicamentos teratogênicos; doenças maternas crônicas ou gestacionais (como diabetes mellitus); infecções maternas como rubéola, citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose, HIV e Zica; e desnutrição materna. Os fatores perinatais são aqueles que incidem durante o parto até completar o primeiro mês de vida da criança, como: hipóxia ou anóxia durante o parto; prematuridade e baixo peso; icterícia grave do recém-nascido. Os fatores pós-natais são aqueles que ocorrem do trigésimo dia de vida da criança até o final da adolescência, como: desnutrição; desidratação grave; carência de estimulação global; infecções como meningite e sarampo; intoxicações exógenas; e acidentes (SILVERMAN, 2009).

A inteligência é uma característica contínua e quantitativa e sua distribuição na população obedece a uma distribuição normal. Essa distribuição está de acordo com o modelo da inteligência ser o resultado da interação de múltiplos genes com o ambiente, caracterizando mecanismo multifatorial. A distribuição de QI na curva de Gauss nos mostra que aproximadamente 2,3% da população apresenta deficiência intelectual, ou seja, um QI inferior a 70. Nestes casos, a DI pode ser explicada pelo mecanismo multifatorial; entretanto na região de extrema esquerda da curva há um excesso de 0,5% de casos de DI que estão fora da distribuição normal e não são facilmente explicáveis pelo modelo de herança multifatorial; este excesso seria, na sua maioria, resultado de causas raras únicas e de efeitos drásticos, puramente genéticos ou puramente ambientais, que se sobrepõem à herança multifatorial. Os casos provavelmente associados a causas genéticas únicas, cromossômicas ou gênicas, são os de interesse para este projeto.

Dados Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística do (IBGE http://www.ibge.gov.br/) do ano de 2013 revelou que 6,2% da população brasileira possui algum tipo de deficiência. Avaliando-se as regiões separadamente, a região Sul apresenta 8,4%, o maior índice guando comparada às demais regiões. Nesse estudo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) considerou 4 tipos de deficiências: auditiva, visual, física e intelectual. De acordo com esse levantamento, 0,8% da população brasileira têm algum tipo de deficiência intelectual, sendo o maior índice no Nordeste, chegando aos 0,9%. A maioria dos pacientes com deficiência intelectual (0,5%) já nasce com essa limitação. Do total de pessoas com DI investigadas, mais da metade (54,8%) tem um grau intenso de limitação, e cerca de 30% frequentam algum serviço de reabilitação específico. Esses dados brasileiros claramente indicam uma subestimativa da DI no país, posto que a taxa de DI estimada se encontra abaixo mesmo das mais baixas estimadas em países desenvolvidos.

#### I.2. Da citogenética clássica aos arrays genômicos

A citogenética tem como foco o estudo do número, estrutura e origem das alterações cromossômicas. Quando associada aos dados de fenótipo, alterações cromossômicas recorrentes podem ser correlacionadas com quadros clínicos. No final do século XIX ocorreram as primeiras incursões no campo da citogenética humana, onde estimativas imperfeitas do número de cromossomos foram realizadas, chegando-se ao número de 16-38 cromossomos (ARNOLD, 1879; WALDEYER, 1888; FLEMMING, 1898); em 1912, Winiwarter fez uma contagem muito mais próxima da realidade, onde ele reportou 47 cromossomos no testículo e 48 no ovário, com um cromossomo X nas células masculina e dois nas femininas (WINIWARTER, 1912); no ano de 1921, Painter visualizou o cromossomo Y, que até então não tinha sido identificado, e concluiu que homens e mulheres tinham o mesmo número de cromossomos: 48 (PAINTER, 1921). Nos 35 anos seguintes, dezenas de estudos confirmaram o número diploide de 48 cromossomos nas células humanas (MAKINO, 1975). Finalmente, em 1956, Tjio e Levan contaram pela a primeira vez 46 cromossomos (TJIO; LEVAN, 1956). Essa contagem correta foi alcançada graças à melhora das técnicas

citogenéticas, especificamente: uso de células em culturas em combinação com colchicina, levando ao acúmulo de metáfases; e uso de solução hipotônica para dispersar os cromossomos. Esses procedimentos haviam sido descritos de forma independente no ano de 1952 por Hsu, Makino e Hughes (HUS, 1952; MAKINO; NISHIMURA, 1952; HUGHES,1952). O número de 46 cromossomos foi confirmado por Ford e Hamerton (FORD; HAMERTON,1956).

A primeira associação entre alteração de cariótipo e quadro clínico foi reportado em 1959, a trissomia do cromossomo 21, visualizada em cultura de fibroblastos de paciente com síndrome de Down (LEJEUNE et al,1959). Na Grã-Bretanha, foram encontradas aneuploidias nos cromossomos sexuais associadas às síndromes de Turner e Klinefelter (FORD et al, 1959 a e b; JACOBS et al.,1959). Após esses achados, houve a descoberta de outras síndromes associadas a aneuploidias, como a trissomia do 13 (PATAU et al,1960) e do 18 (EDWARDS et al,1960). Nesse mesmo período também foi descoberto um cromossomo 22 aparentemente menor (cromossomo Filadélfia,) em células de pacientes com leucemia mielóide crônica (NOWELL; HUNGERFORD, 1960); várias décadas foram necessárias até a caracterização dessa alteração cromossômica somática em células com câncer.

A análise e estudo dos cromossomos se tornou mais acessível no final do ano de 1960, quando as culturas de linfócitos de sangue periférico começaram a ser utilizadas em decorrência da adição de fitohemaglutinina (MOORHEAD et al., 1960), que estimula a divisão de linfócitos T, seguidas dos já conhecidos tratamentos com colchicina, que interrompia o funcionamento dos fusos mitóticos, e solução hipotônica, que permitia que os cromossomos fossem espalhados em lâminas e estudados, consolidando métodos necessários à citogenética humana (FERGUSON-SMITH, 1960, 1961).

Em 1969-1970 foi introduzida a técnica de bandeamento, permitindo a identificação de cada um dos cromossomos humanos e de alterações estruturais que modificassem o padrão de bandas. O primeiro método descrito foi o bandeamento Q, que recebeu esse nome por usar a quinacrina, uma substância fluorescente, que se intercala com o DNA produzindo bandas escuras e claras visíveis à microscopia fluorescente com UV (CASPERSSON et al., 1970). Após

a descoberta do bandeamento Q, o bandeamento G foi descrito (SEABRIGHT, 1971), e é até hoje o mais utilizado para diagnósticos clínicos, por não necessitar fluorescência para a sua visualização. Apesar da citogenética clássica ter permitido a identificação dos cromossomos e alterações estruturais, sua resolução é limitada a 5-10 Mb. A melhora da resolução, e consequentemente uma detecção de alterações cromossômicas menores ou não identificáveis por técnicas de bandeamento, ocorreu com o surgimento de técnicas de hibridação *in situ,* introduzindo a citogenética molecular.

Pardue e Gall foram os primeiros a usarem hibridização *in situ* para mapear sequências de DNA nos cromossomos, marcando genes ribossomais com radioisótopos e mapeando-os em braços curtos de cromossomos acrocêntricos (PARDUE; GALL, 1970); essa técnica não foi eficiente para mapear genes de cópia única, o que só ocorreu com o desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, nas quais fragmentos de DNA eram clonados em vetores de fagos ou plasmídeos, permitindo a produção de uma quantidade grande de cópias dos genes e de sua detecção por autoradiografia (MALCOLM et al.,1981). No entanto, a hibridação *in situ* só passou a ser de fato utilizada quando a marcação radioativa foi substituída por não isotópica, em particular com detecção fluorescente, surgindo assim a técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), que se tornou então o método padrão para o mapeamento genético em cromossomos (PINKEL et al., 1986; LICHTER, et al., 1990).

A citogenética molecular possibilitou a visualização de alterações cromossômicas envolvendo pequenos segmentos de DNA, com resolução ao menos duas ordens de magnitude maior do que a citogenética clássica. Essa técnica de hibridização de sequências conhecidas de DNA a cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos seguida de análise microscópica, embora de alta resolução, é de difícil automação e de análise laboriosa; além disso FISH apresenta a limitação do número de sequências alvo que podem ser simultaneamente investigadas, na maioria dos laboratórios limitada a 3-4 cores.

A técnica de *Microarrays* genômicos foi inicialmente desenvolvida baseada na técnica da hibridização comparativa de genomas (CGH) (KALLIONIEMI et al., 1992), que utilizava o DNA teste como sonda fluorescente e cromossomos como

alvo da hibridização, possibilitando a visualização de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos no genoma inteiro, comparando o DNA genômico de pacientes com o de um controle normal. Apesar dessa técnica de CGH aumentar o potencial de detectar anormalidades cromossômicas e ter a vantagem (sobretudo para o estudo de câncer) de não necessitar células em divisão do material testado, a resolução não foi melhorada significantemente quando comparada à citogenética clássica (> 3 Mb). O desenvolvimento do CGH baseado em *arrays* (*array*-CGH) substituiu o uso de cromossomos por sequências de DNA aderidas a lâminas, aumentando assim a resolução e possibilitando a detecção de variações em número de cópias (*copy number variation* - CNV) de segmentos cromossômicos submicroscópicos. Assim, informação de ganho e perda de segmentos menores de material genético podia ser obtida (SOLINAS-TOLDO et al., 1997; PINKEL et al., 1998).

As primeiras sondas de DNA usadas em lâminas de microarray eram segmentos de DNA humano (>150 kb) inseridos em cromossomos artificiais bacterianos sondas (BACs); posteriormente, o uso de sintéticas е menores (oligonucleotídeos) permitiram melhorar a resolução da técnica para < 50kb. Com o surgimento dos SNP arrays, se tornou possível, além da estimativa do número de cópias de sequências de DNA, investigar simultaneamente os genótipos através dos polimorfismos de sequência única (SNPs); em especial, os arrays de SNP detectam segmentos cromossômicos em homozigose, que podem indicar consanguinidade ou dissomia uniparental (SNIJDERS et al., 2001; ROPERS et al., 2003; CHUNG et al., 2004; BRENNAN et al., 2004; CARVALHO et al., 2004; DE LEEUW et al., 2012).

No diagnóstico clínico, tanto o *array*-CGH de oligonucleotídeos como a genotipagem de SNPs, são competentes em diagnosticar microdeleções/microduplicações cromossômicas associadas a deficiência intelectual idiopática (RIEGEL, 2014).

Do ponto de vista diagnóstico da etiologia da DI, o cariótipo identifica alterações em apenas 4% dos pacientes (excluindo os casos de trissomia do 21), dos quais 1% são anomalias numéricas e 3% anomalias estruturais. A técnica de FISH permitiu elucidar mais 2,5-5% dos casos que não apresentam alterações no cariótipo. Os *arrays* comercializados atualmente ultrapassam 2 milhões de sondas, que corresponde a uma resolução de 10 a 100 kb e levou à detecção de alterações em 15-20% (adicionais) dos casos de DI. No entanto, mesmo com a aplicação dessas técnicas, muitos casos de DI idiopática permanecem sem elucidação de causas genéticas, necessitando de técnicas com melhor resolução (VISSERS et al., 2003; DE VRIES, 2005; VAN KARNEBEEK et al., 2005; RAVNAN et al., 2006; MILLER et al., 2010).

Uma revisão completa detalhada sobre a evolução das técnicas citogenéticas pode ser encontrada em Ferguson-Smith (2015).

#### I.3. Sequenciamento: de Sanger a Next Generation Sequence

A citogenética clássica e mesmo a molecular são limitadas à detecção de alterações de vários Kb e não permitem a descoberta de variantes de uma ou poucas bases do genoma, que necessitam sequenciamento do material genético para a sua identificação.

Em 1975 Sanger publicou um método de sequenciamento que levou seu nome, e até no início dos anos 90 o sequenciamento de DNA era realizado exclusivamente pelo método desenvolvido por Sanger, com implementações semi-automáticas, onde o sequenciamento ocorria em capilares. Nesta metodologia, as sequências alvo são amplificadas por clonagens em plasmídeos ou PCR. O sequenciamento ocorre por ciclos, nos quais os fragmentos são (ddNTPs). adição de didesoxinucleotídeos terminados com а Os didesoxinucleotídeos não possuem o grupo hidroxila livre na extremidade 3' e, por isso, interrompem a polimerização da cadeia, gerando diferentes fragmentos, com tamanhos distintos, que são separados por tamanho por eletroforese, inicialmente incorporando radioatividade para detecção e posteriormente por fluorescência associada aos ddNTPs. A informação da base na qual ocorreu interrupção da síntese é transformada em sequência de DNA. Depois de três décadas de aplicações e melhorias, a técnica de Sanger é geralmente usada para obter reads de aproximadamente 1000 pares de base (pb); a exatidão por

base é de 99,999%, e o custo por kilobase é de aproximadamente \$0.50 (SHENDURE; JI, 2008).

O sequenciamento de Sanger foi utilizado para realizar o primeiro sequenciamento do genoma humano concluído em 2001, (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001) e também em 2007 para o primeiro sequenciamento de um indivíduo diploide (J. Craig Venter) (LEVY et al., 2007). Apesar destes grandes feitos, e de algumas alterações em genes terem sido associadas à DI pela técnica de sequenciamento Sanger, essa técnica não é aplicável para a descoberta rotineira de alterações em todo o genoma.

Durante as últimas décadas, vários estímulos levaram ao desenvolvimento e otimização de tecnologias de sequenciamento: um deles foi o Projeto Genoma Humano, que permitiu a otimização e redução de custo do sequenciamento; o potencial das *short reads* também é outro fator que teve um papel nesse estímulo. O termo *short reads* era a princípo utilizado para descrever essas novas tecnologias que produziam *reads* de menor tamanho quando comparado às técnicas anteriores, permitindo um sequenciamento com boa cobertura. Assim como novas metodologias, que permitiram um maior acesso às variações genéticas, e o desenvolvimento da bioinformática como uma importante aliada nesse novo campo, novas tecnologias se desenvolveram, permitindo a descoberta de novas variações e genes ligados a várias doenças, dentre elas a deficiência intelectual (SHENDURE, et al., 2004; ZANG et al., 2011).

Pouco depois disso, para o segundo indivíduo que teve seu genoma sequenciado (James D. Watson), foi utilizado o sequenciamento de nova geração, NGS (*Next Gerneration Sequencing*), sendo o primeiro genoma humano sequenciado com essa nova tecnologia (WHEELER et al., 2008).

Na última década, várias técnicas de sequenciamento de nova geração foram descritas. Essas técnicas têm como base a construção de bibliotecas a partir da fragmentação randômica do DNA, seguida de ligação a sequências denominadas adaptadores, e a geração de *amplicons* em clusters por diversos métodos, como por exemplo PCR em emulsão ou PCR em ponte. Grande número desses fragmentos são então sequenciados em paralelo, gerando

35
grandes quantidades de dados de sequenciamento, e também alta cobertura de um número elevado de regiões genômicas de interesse. Os fragmentos ou *reads* geradas nesse tipo de sequenciamento são menores (5-500 pb) quando comparadas às geradas por Sanger (vários Kb), fazendo com que alta cobertura seja de suma importância em NGS. A enorme quantidade de dados gerados por esse método origina novos problemas, como o processamento, a análise e o armazenamento da imensa quantidade de informação obtida. Portanto, são necessárias ferramentas computacionais muito mais sofisticadas e grande poder de processamento (MARGULIES et al., 2005; BENTLEY et al., 2008; TRAPNELL; SALZBERG, 2009; APARICIO; HUNTSMAN, 2010; BOYD, 2013).

### I.3.1 Plataformas de NGS

Existem diversas técnicas bioquímicas usadas tipo de para esse sequenciamento e, consequentemente, diversos sequenciadores. 0 pirosequenciamento do 454 da Roche, foi a primeira plataforma comercialmente disponível para o NGS; nesse aparelho, a biblioteca construída é ligada à *primers* que se encontram na superfície esférica de uma bead, onde ocorre uma PCR em emulsão gerando amplicons em clusters. Pequenas beads também são adicionadas com enzimas imobilizadas, as quais serão necessárias para o pirosequenciamento (ATP sulfurilase e a luciferase); os nucleotídeos são adicionados em ciclos juntamente com o substrato das enzimas (adenosina 5'fosfosulfato). A adição dos nucleotídeos de acordo com a complementariedade leva à liberação de um pirofosfato, o qual é convertido em ATP, para gerar oxyluciferina e luz, que é computada. A limitação dessa tecnologia está no sequenciamento de homopolímeros; a adição de nucleotídeos iguais seguidos pode levar a um erro no estabelecimento do tamanho do homopolímero devido à intensidade de luz que é gerada; devido a esse fator, a detecção de inserções e deleções é mais propensa a erros do que a substituição de bases. O tamanho das reads geradas por essa plataforma é um ponto positivo, que varia entre 200-300 pb. O custo de sequenciamento nessa plataforma é de aproximadamente \$60 por megabase (RONAGHI, 2001; SHENDURE; JI, 2008; ROCHE, 2008).

Posteriormente, muitas outras plataformas foram desenvolvidas visando melhorar a qualidade e o desempenho desse processo. Na plataforma Illumina/Solexa, a biblioteca construída a partir da fragmentação do DNA se liga a sequências complementares de oligonucleotídeos que se encontram fixos em uma lâmina; a extremidade livre também se liga a oligonucleotídeos complementares na mesma lâmina formando uma estrutura em ponte. Esses segmentos são amplificados pela polimerase formando clusters com aproximadamente 1000 amplicons (PCR de fase sólida), que em seguida são transformados em fita simples e se associam a primers de acordo com a complementariedade. Uma mistura de nucleotídeos terminadores marcados é fornecida e adicionada de acordo com a complementariedade; a fluorescência do nucleotídeo adicionado é capturada e gravada na imagem. Com a remoção do bloqueador, um novo ciclo de adição de nucleotídeo se inicia e continua até obtermos as sequências de todos os fragmentos. As reads geradas por essa plataforma são tipicamente de 36 pb e a obtenção de *reads* maiores resulta em taxa de erro mais elevada, sobretudo de substituições. O erro gerado no sequenciamento de homopolímeros é menor que com o pirosequenciamento 454. O custo de sequenciamento nessa plataforma é de aproximadamente \$2 por megabase (FEDURCO et al., 2006; SHENDURE; JI, 2008).

Na plataforma **SOLiD** as bibliotecas geradas são ligadas em *beads*, e passam por um processo de PCR em emulsão, no qual os *amplicons* gerados ficam na superfície das *beads* magnéticas, que por sua vez estão imobilizadas em uma superfície sólida gerando um denso e desordenado *array*. O sequenciamento é guiado preferencialmente por uma DNA ligase. No processo de sequenciamento um *primer* universal complementar aos adaptadores é associado a esses *amplicons* e em seguida octâmeros marcados com fluorescência são adicionados de acordo com a complementariedade. A fluorescência da 5ª base é identificável e registrada na imagem. O octâmero então é clivado e, em seguida, outros ciclos de adição de octâmeros ocorrem, levando à identificação a cada 5 bases (base 5, 10, 15, 20, 25 ...). Com o término do sequenciamento do fragmento, o sistema é reiniciado e pode ser direcionado para a identificação da base que esteja em outra posição, como por exemplo a 4ª, levando à descoberta daquelas que estão nas posições 4, 9, 14, 19, 24, e assim por diante.

As *reads* geradas nesse processo possuem um comprimento de 35 pb e o custo por megabase é \$2. Os erros mais comuns são gerados no sequenciamento das substituições (MCKERNAN et al., 2006; SHENDURE; JI, 2008).

O sequenciamento na plataforma **Heliscope** difere um pouco dos outros porque nenhuma amplificação clonal é necessária As bibliotecas preparadas passam por uma adição de calda poli A e esses fragmentos são capturados por hibridação a uma superfície contento oligômeros de poli T, formando um *array* desordenado. *Primers* são utilizados, e a cada ciclo nucleotídeos marcados com fluorescência são adicionados; depois da aquisição de imagens, a fluorescência é clivada permitindo a adição do próximo nucleotídeo, formando *reads* com comprimento de 30 pb. Nesse sequenciamento, os nucleotídeos não possuem terminadores no final do nucleotídeo, levando a uma taxa de erro semelhante à do pirosequenciamento durante a leitura de homopolímeros; o custo por megabase é \$1 (SHENDURE; JI, 2008).

Outra plataforma disponível para o NGS, é o **lon Torrent:** nela o sequenciamento se baseia na liberação de prótons (H+) que ocorre quando um dNTP é normalmente incorporado na cadeia de DNA em crescimento; os mesmo nucleotídeos são adicionados a micro poços onde a molécula de DNA se encontra associada a *beads*; se há complementariedade eles são incorporados por uma DNA polimerase e os poços que liberaram H+ vão ter o pH da sua solução alterado; essa mudança será detectada por um aparelho sensível a íons e a informação é transmitida a um computador e transformada em sequência de DNA. No próximo ciclo os dNTPs que não se ligaram são lavados, e há uma nova adição de nucleotídeos de outro tipo. Este sequenciamento gera uma acurácia de 99,6%, suas reads possuem em torno de 100 pb, e apresenta limitação no sequenciamento de homopolímeros. O custo por corrida é de cerca de \$1000 (RUSK, 2011; PERKEL, 2011).

O **PacBio** é um sequenciamento em tempo real, onde a DNA polimerase se encontra em poços onde está um detector ótico denominado *zero-mode waveguides* (ZMW); à medida em que o DNA vai sendo amplificado com a adição de dNTPs fluorescentes, essa marcação é detectada pelo detector, e dessa forma o material pode ser sequenciado permitindo o acompanhamento em

38

tempo real. Não é necessário PCR antes desse sequenciamento, e as *reads* geradas possuem vários megabases; a acurácia é de 86% e o preço da corrida é de \$400; a taxa de erro dessa plataforma é alta (~13%) se comparada com a da Illumina (~0,1%) (ENGLISH et al., 2012; WU et al., 2014), porém o grande tamanho dos reads é uma grande vantagem nos casos de sequenciamento de novo.

Mais recentemente a Oxford nanopore Technologies<sup>™</sup> lançou o **MinION** onde, como no caso do **PacBio**, o DNA não precisa ser amplificado. Após a sua fragmentação, o DNA passa através de nanoporos (fita simples), alterando a voltagem de modo específico para a sequência, permitindo assim a distinção dos nucleotídeos que passam através dele. Longas *reads* de 230-300 Kb são geradas, com acurácia entre 70-85%; o custo por kit de corrida é de \$1000 (ASHTON et al., 2015; LAVER et al., 2015).

As *reads* obtidas durante esses sequenciamentos podem ser classificadas em dois tipos: *paired-end* ou *mate-paired*. As *reads paired-end* são formadas quando os fragmentos de DNA possuem suas extremidades reparadas, adeniladas e associadas a adaptadores; o produto é então amplificado e sequenciado a partir das duas extremidades. As *reads mate-paired*, surgem a partir de fragmentos maiores de DNA, onde ambas as pontas são reparadas com dNTPs associados com biotina; as pontas do fragmento se associam, tornando-o circular; ocorre uma nova fragmentação dessa molécula circular, gerando fragmentos de 400-600 pb. Desse pool de fragmentos resultantes, aqueles que ficaram com a biotina são capturados usando estreptavidina, e passam por etapas de enriquecimento, reparo, e associação com adaptadores; posteriormente eles são sequenciados a partir das duas pontas (KORBEL et al., 2007).

As técnicas de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – *NGS*) permitem a averiguação de variantes em grande quantidade de sequências-alvo e apontam possíveis mutações somáticas *de novo*; potencialmente podem também ser usadas para estimar número de cópias de sequências de DNA (CNVs). Pode-se sequenciar o genoma completo ou capturar as regiões de interesse (por exemplo, sequenciamento de exomas) (KORBEL et al., 2007; VAN TASSELL et al., 2008; LI et al., 2009; QIN et al.,

2010). A **Tabela 1** compara algumas características das diferentes plataformas de NGS.

Uma série de ferramentas estão disponíveis para a análise de dados gerados por sequenciamento, que consiste basicamente em: alinhamento das reads com um genoma de referência; detecção de variantes comparado ao genoma referência; anotação de variantes com informações de bancos de dados; visualização das variantes em *genome browsing*.

Plataforma	Tempo	Metodologia	Gb/corrida	Tamanho das reads (pb)	Acurária	Preço
454 Roche	28 horas	Pirosequenciamento	0,7	200-300	99,50%	\$60 por megabase
Hi-seq Illumina	2 dias	Terminadores reversíveis	120	36	99,90%	\$2 por megabase
SOLiD	8 dias	Octâmeros e ligase	150	35	99,94%	\$2 por megabase
lon Torrent	2 horas	Detecção de prótons	100	100-200	99,60%	\$1000 por corrida
Heliscope	8 dias	Polimerase	28	30	-	\$1 por megabase
PacBio	20 minutos	Sequenciamento em tempo real	3	>10 <sup>9</sup>	86%	\$400 por corrida
MINion	15 - 60 minutos	Sequenciamento em tempo real	-	230.000- 300.000	70-85%	\$1000 por corrida

Tabela 1: Comparação de alguns parâmetros das plataformas de NGS.

## I.3.2 Estratégias para o uso do NGS

As plataformas de NGS nos fornecem a possibilidade de usar vários métodos para responder muitas perguntas sobre diferentes organismos. As abordagens mais utilizadas são: sequenciamento do genoma total (de novo ou resequenciamento); sequenciamento de sequências-alvo (exoma ou painéis); transcriptoma (RNA total, RNAm, RNA alvo, SnRNAs); estudo epigenômico (identificação das bases metiladas); ChIP; perfil ribossômico.

O sequenciamento de genoma total (*whole genome sequencing* - WGS) possui algumas vantagens em relação ao sequenciamento total dos exons (*whole exome sequencing* - WES): utilizando o WGS é possível a detecção de SNVs, indel e CNVs em regiões codificadoras e não codificadoras; a cobertura é mais confiável do que no caso de sequências-alvo, uma vez que a captura dos exons pode resultar em viés no tipo e quantidade de sequências. Porém, o custo para um sequenciamento total do genoma ainda é bastante elevado, cerca de \$1.700 por amostra com uma cobertura de 35X. (ZHANG et al., 2011a, 2011b; GENOHUB INC, 2012-2015); adicionalmente, a quantidade de dados para analisar e armazenar são muito maiores do que, por exemplo, de um exoma.

Se regiões específicas do DNA forem o alvo, técnicas que sequenciam só essas regiões podem ser mais eficientes e possuir menor custo, como no caso do WES que sequencia apenas as regiões codificadoras do DNA, que correspondem a ~1-3% do genoma. O custo neste caso é aproximadamente 5 vezes menor quando comparado com o WGS (KIEZUN et al., 2012).

Atualmente existem vários kits comerciais disponíveis para o sequenciamento de exoma; em 2015 Shigemizu e colaboradores compararam o desempenho dos quatro principais kits utilizados para WES: NimbleGen's SeqCap EZ Human Exome Library (Roche), Illumina Nextera Rapid Capture Exome (Illumina), Agilent SureSelect XT Human All Exon (Agilent Technologies), Agilent SureSelect QXT (Agilent Technologies). Embora todas essas plataformas usem DNA ou RNA biotinilados para capturar as regiões que contém exons, elas diferem na seleção da região alvo, no tamanho e densidade da molécula usada para captura, e na fragmentação do DNA. Esse estudo comparou a captura das regiões alvo, a cobertura das mesmas, a eficiência do enriquecimento do alvo, e a detecção de SNV; com relação à captura das regiões alvo, os quatro kits mostraram concordância em 35.9 Mb de bases, o kit NimbleGen mostrou uma maior especificidade na captura de regiões alvo quando comparado aos outros, com a captura de 14,7 Mb bases de forma específica, contra 6,2 dos kits da

41

Agilent e 1.5 da Ilumina. O número de *reads* de cada uma das quatro plataformas foi de ~ 75 milhões sendo que no mínimo 88% apresentou uma cobertura de ao menos 10X na região alvo. O kit da Illumina foi o que mostrou um enriquecimento da região alvo menos eficiente. Na **Tabela 2** encontra-se uma comparação desses quatro kits com informações extraídas desse estudo e com informações coletadas nos protocolos de cada um (SHIGEMIZU et al., 2015).

**Tabela 2**: Comparação entre quatro principais kits comerciais disponíveis para sequenciamento de exoma.

X	NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library (Roche)	Illumina Nextera Rapid Capture Exome	Agilent SureSelect XT Human All Exon	Agilent SureSelect QXT
Região alvo	63,6 Mb	45,1 Mb	50,4 Mb	50,4 Mb
Tipo de sondas	<i>beads</i> biotiniladas de DNA	<i>beads</i> biotiniladas de DNA	<i>beads</i> biotiniladas de RNA	<i>beads</i> biotiniladas de RNA
Quantidade de DNA necessária	1 µg	50 ng	1 µg	1 µg
Cobertura da região alvo (10X - 75 M*)	88.4%	88.9%	91.5%	92.0%
Eficiência do enriquecimento (região alvo - 75M*)	85.2%	58.9%	89.9%	83.7%
Detecção de SNV	93.413	69.372	78.492	76.183
Preço por captura (dólar)	\$600	\$1,500	\$250	\$250
Genoma de referência	GRCh37 (hg19)	GRCh37 (hg19)	GRCh37 (hg19)	GRCh37 (hg19)

\*75 milhões de reads

## I.3.3 Bioinformática e NGS

Com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração, um grande desafio passou a ser a interpretação e armazenamento da quantidade de dados gerados. O primeiro passo para analisar esses dados é mapear as *reads* contra um genoma de referência e identificar as regiões no sequenciamento que diferem da referência (chamada de variantes); vários algoritmos são utilizados para eliminar as sequências repetitivas, distribuídas por todo o genoma; esse primeiro passo deve ser realizado com eficiência pois é crucial para análise dos dados (FLICEK; BIRNEY, 2009; LI; HOMER, 2010; ZHANG et al., 2011a, 2011b).

O próximo passo é fazer a anotação baseada em bancos de dados para se avaliar a possível patogenicidade da variante. Esses bancos reúnem informações de frequências populacionais, variantes e genes associados a fenótipos, etc. Os bancos de dados mais frequentemente utilizados estão listados na **Tabela 3**.

Adicionalmente, predição funcional das variantes é feita usando algoritmos que estimam o efeito da variante na estrutura e função das proteínas, tais como: SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*), que se baseia na homologia e propriedades físicas dos aminoácidos(NG; HENIKOFF, 2001,2002); MAPP (*Multivariate Analysis of Protein Polymorphism*) (STONE; SIDOW,2005); PhD-SNP (*Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms*), que classifica se uma mutação na proteína pode ser associado a alguma doença ou a polimorfismo (CAPRIOTTI et al., 2006); PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) (LI et al., 2009).

Para a análise bioinformática alguns programas, comerciais ou não, podem ser utilizados. No nosso projeto, utilizamos o VarSeq, desenvolvido pela Golden Helix, que será discutido na metodologia.

**Tabela 3**: Bancos de dados utilizados frequentemente para anotação e análisede variantes detectadas através do sequenciamento total ou parcial do genomahumano.

Banco de dados	Informações	Site
1000 Genomes project	Catálogo público com dados de genótipo e variações genéticas humanas; objetiva encontrar >95% das variações genéticas com frequência de pelo menos 1% no genoma e de 0,1-0,5% nos genes.	browser.1000genomes.org
dbSNP	Variações polimórficas ≤50 pb em 53 espécies. Documenta 154 milhões de RefSNPs humanos	ncbi.nlm.nih.gov/snp
ClinVar	Variantes no genoma humano e seu fenótipo	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
ΟΜΙΜ	Genes e doenças genéticas mendelianos nos seres humanos	omim.org
Human Genome Variation society (HGVS)	Lista e links para bancos de dados que documentam variação no genoma humano	hgvs.org/dblist
Exome agregation Consortium (ExAC)	Variantes encontradas no sequenciamento de exoma de 61,706 indivíduos não relacionados, coletadas de projetos populacionais ou de patologias específicas	exac.broadinstitute.org
Exome Variant Server	Variantes encontradas no sequenciamento de exoma de indivíduos com ancestralidade europeia e afro americana visando identificar variantes associadas com doenças do coração, pulmão e sangue	evs.gs.washington.edu/EVS
RefSeqGene	Define a sequência genômica a ser usada como referência para genes bem caracterizados	ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg
Ensembl	Database genômico para vertebrados e outros eucariotos	ensembl.org

NCBI Genome	Informação sobre genomas, incluindo sequência, mapas, cromossomos e anotações	ncbi.nlm.gov/genome
CCDS Genes	Identifica o conjunto de regiões que são consistentemente anotadas e com alta qualidade (consenso) nos genomas humano e de camundongos	ncbi.nlm.nih.gov/CCDS

## I.4. A genética da deficiência Intelectual

No ocidente, DI associada ou não a outras alterações congênitas é a razão mais comum que leva as famílias a procurarem um serviço de aconselhamento genético, mas até alguns anos atrás a realização de cariótipo e triagem para doenças metabólicas só elucidava 40% dos casos de pacientes com DI idiopática. Entre as causas genéticas associadas à deficiência intelectual, estão: alterações cromossômicas; doenças complexas, causadas por mutações em vários genes; e distúrbios monogênicos (MOESCHLER; SHEVELL, 2006; RAUCH et al., 2006; KRIEK et al., 2007).

As formas leves de DI são mais frequentemente resultantes de uma interação de fatores ambientais e genéticos e, devido à sua complexidade, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que estão atuando na sua predisposição. Outro fator que dificulta o estudo genético das formas menos graves da DI é a distinção nem sempre evidente do quadro clínico do afetado e de um indivíduo não afetado (ROPERS, 2010). Durante a década passada, progresso significativo foi alcançado na elucidação dos fatores genéticos responsáveis por DI, sobretudo das formas grave e moderada: além dos 15% dos pacientes que apresentavam aberrações cromossômicas visíveis por técnicas citogenéticas, deleções e duplicações submicroscópicas também foram identificadas como uma causa importante da DI (LEONARD; WEN, 2002).

Nos anos 90 a busca por genes associados a DI foi focada no cromossomo X, uma vez que o número de homens afetados era superior ao número de mulheres em cerca de 1,5 (LEONARD; WEN, 2002). Também, a manifestação em hemizigose transmitida por portadoras normais facilitou a identificação de famílias onde a DI de herança ligada ao X segregava. Esses estudos só encontraram genes que justificassem 10-12% da DI nos homens, muito menos do que o esperado se o excesso nos homens de 28,5% na DI grave e quase 50% na moderada fosse exclusivamente ocasionado por genes ligados ao X (ROPERS; HAMEL, 2005). Após esses estudos, ficou evidente a importância da identificação de novas mutações e variantes em genes que justifiquem casos de DI e que mapeiam em autossomos, sejam elas dominantes ou recessivas.

#### I.4.1 Alterações cromossômicas associadas a DI

A alteração cromossômica mais comumente associada com deficiência intelectual é a trissomia do cromossomo 21, que é também a causa genética mais frequente na DI; em várias coortes de pacientes com DI, a frequência da síndrome de Down chega a ser maior do que 12% (LEONARD; WEN, 2002).

Outras alterações cromossômicas numéricas e estruturais detectadas por microscopia óptica são menos frequentes em pacientes com deficiência intelectual e, devido à resolução relativamente baixa de 5-10 megabases do cariótipo por bandeamento G, diagnóstico é obtido em apenas 4% dos casos, excluídos aqueles explicados pela trissomia do 21 (VAN KARNEBEEK et al., 2005). Um estudo em larga escala feito por Hochstenbach e colaboradores em 2009 comprovou essa porcentagem: em 36.325 pacientes com DI idiopática, a frequência de alterações estruturais era de apenas 4,6% e rearranjos aparentemente balanceados, como as translocações recíprocas e inversões, correspondiam a 1% desses achados (HOCHSTENBACH et al., 2009).

FISH, inicialmente desenvolvido no final da década de 80, apresenta resolução > 20 kb porém, ao contrário do cariótipo por bandeamento que investiga o genoma inteiro, FISH investiga um número limitado de alvos. O desenvolvimento de sondas específicas para as extremidades cromossômicas combinadas com o uso de FISH (LEDBETTER; MARTIN, 2007) mostraram que alterações subteloméricas são responsáveis por 2,5% a 5% dos casos de DI idiopática e cariótipo normal (DE VRIES et al., 2003, 2005; RAVNAN et al., 2006). Estudos já detectaram uma frequência muito maior entre indivíduos com DI moderada a grave (7,4%) e muito mais baixa na DI leve (0,5%) (KNIGHT et al., 1999, FLINT; KNIGHT, 2003).

Com o desenvolvimento do *array*-CGH ficou evidente que não apenas alterações terminais, mas também intersticiais, eram causa importante de DI. Estudos de indivíduos com DI idiopática e cariótipo normal por *array*-CGH mostraram que alterações cromossômicas submicroscópicas patogênicas (duplicação e deleção) estavam presentes em 15-20% nesses pacientes (DE VRIES et al., 2005; ROSENBERG et al., 2006; FRIEDMAN et al., 2006; JAILLARD et al., 2009, 2010; KOOLEN et al., 2009; ROPERS, 2010). Com o tempo, novas CNVs foram associadas com fenótipos específicos em pacientes com DI, e novas síndromes de microdeleção e duplicação intersticiais foram identificadas (JAILLARD et al., 2009, 2010; VISSERS et al., 2010). Vários estudos já demonstraram que alterações submicroscópicas representam causa de alguns quadros de DI, e que outras são fatores de predisposição para doenças neuropsiquiátricas, como a deficiência intelectual e autismo.

O fato de *array*-CGH levar ao diagnóstico 15-20% dos casos de DI idiopática levou à recomendação que *array*-CGH fosse usado como primeira linha de investigação nesses casos, precedendo o cariótipo (MILLER et al., 2010).

**Tabela 4**: Algumas alterações cromossômicas detectadas por *array*-CGH associadas a deficiência intelectual.

Alterações cromossomicas	Referência
Microdeleção 1q21	SHARP et al., 2006 BRUNETTI-PIERRI et al., 2008
Microdeleção 3q.29	WILLATT et al., 2005
Microdeleção 5q35	TATTON-BROWN et al.,2005 KUROTAKI et al., 2005
Microdeleção 7q11.23	GRIMM; WESSELHOEFT, 1980
Microduplicação 15q13.1	SHARP et al., 2006 VAN BON et al., 2009

Microdeleção 16p11.2	SHINAWI et al., 2010
Microdeleção 17q12	MULLER et al., 2006 MEFFORD et al., 2007
Microduplicação 17q21.31	KIRCHHOFF et al., 2007 GRISART et al., 2009
Microdeleção 22q11.21-q.11.23	BEN-SHACHAR et al., 2008

### I.4.2 DI monogênica associada ao cromossomo X

Como já mencionado anteriormente, alterações no cromossomo X são causas comuns de DI moderada e grave em homens; o interesse nesse cromossomo teve início quando diferentes grupos de pesquisa observaram que atrasos cognitivos eram mais comuns em homens do que em mulheres (LEHRKE, 1972, 1974; PENROSE, 1938). Estudos iniciais nesse cromossomo levaram à descoberta de expansão do trinucleotídeo CGG (acima de 200 repetições) na região 5' UTR do gene *FMR1* em indivíduos afetados por DI de herança ligada ao X (Xq27.3). Essa alteração dominante ligada ao X foi relacionada à síndrome do X frágil e é a forma mais frequentes de deficiência intelectual herdada (CRAWFORD et al., 2001; HAGERMAN R.; HAGERMAN P., 2002).

Outras alterações no cromossomo X foram detectadas em famílias nas quais a DI segregava com padrão de herança ligado ao X (*X-linked intellectual disability*, XLID). Esse grupo é bastante heterogêneo e é subdividido em DI sindrômica (S-XLID) e não sindrômica (NS-XLID), embora essa distinção não seja sempre evidente. Por exemplo, o primeiro gene associado a NS-XLID (*OPHN1*) foi posteriormente associado a um quadro sindrômico (BILLUART et al., 1998; BERGMANN et al., 2003; PORTES et al., 2004).

Consórcios como o EURO-MRX (http://www.euromrx.com), com um banco de dados com mais de 600 famílias nas quais a DI segregava com padrão compatível com recessivo ligado ao X, aceleraram a descoberta de genes associados a XLID. Em 1996, eles identificaram o primeiro gene associado a

XLID, *FMR*2. Através de mapeamento de pontos de quebra e de *array*-CGH, esse consórcio já levou à identificação de 16 genes associados a NS-XLID e 66 associados a quadros de S-XLID (EURO-MRX, 2016). De acordo com Ropers (2010), já em 2010, 91 genes haviam sido associados com XLID, sendo 41 deles associados a quadros não sindrômicos. Em 2013 (PITON et al., 2013), o número de genes associados a quadros de XLID já era 106. Genes associados a DI descritos com base no uso de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) serão abordados separadamente em outro tópico.

A busca por genes associados a DI foi se expandindo não apenas no estudo do cromossomo X mas também dos autossomos, uma vez que os achados no cromossomo X pareciam ser insuficientes para explicar o excesso de homens afetados com DI (ROPERS, 2010).

### I.4.3 DI monogênica associada a autossomos

As formas graves autossômicas dominantes de DI são quase todas alterações de novo, devido ao fato do portador de tal mutação raramente se reproduzir; apesar de não serem raras, muito pouco ainda se sabe sobre essas mutações, mas elas geralmente afetam complexos proteicos que atuam na sinapse do sistema nervoso central, que são de extrema importância para a plasticidade neuronal e cognição (LAUMONNIER et al., 2007; HUMEAU et al., 2009). Vários exemplos podem ser citados de mutações de novo que foram identificadas em pacientes com DI: dentre eles, Hamdan e colaboradores em 2009 identificaram 3 mutações de novo em heterozigose truncando o gene *SYNGAP1*, que é expresso na sinapse (HAMDAN et al., 2009a); outras alterações revelaram novos genes de DI autossômica dominante (**Tabela 5**), mostrando que, em populações ocidentais, mutações em genes autossômicos expressos no cérebro são causa comum de DI idiopática (ROPERS, 2010).

O estudo sobre DI autossômica recessiva (ARID) demorou a se desenvolver, em parte porque na Europa e Estados Unidos, onde acontecem a maioria das pesquisas, as famílias são pequenas e a maioria dos pacientes com ARID são casos isolados. As formas não sindrômicas de ARID (NS-ARID) são de difícil distinção, dada a inespecificidade do quadro clínico. Outro fator que dificulta a

pesquisa de ARID é a baixa taxa de casamento consanguíneos nessas populações. Consequentemente, até 2006, poucos loci de NS-ARID eram conhecidos. Em 2007, Najmabadi e colaboradores mapearam regiões de homozigose em 78 famílias Iranianas consanguíneas, com duas ou mais crianças com DI em cada família; com esse estudo, eles verificaram que as alterações autossômicas recessivas em DI são extremamente heterogêneas, e identificaram 8 novos loci para DI autossômica recessiva não sindrômica, como o gene *GRIK2*. Em populações onde os casamentos consanguíneos são comuns, as alterações autossômicas recessivas são responsáveis pela maioria dos casos de DI e mesmo em populações sem casamento consanguíneo, herança recessiva está associada a 13-24% dos casos (NAJMABADI et al., 2007). Atualmente cerca de 40 genes foram associados com formas não sindrômicas autossômicas recessivas de DI (MUSANTE; ROPERS, 2014; AHMED et al., 2015).

As técnicas de citogenética e o sequenciamento Sanger ajudaram a elucidar muitas alterações em genes associadas a DI, porém muitos pacientes ainda permanecem sem diagnóstico. A evolução de técnicas citogenéticas e a implementação de novas técnicas, como o *Next Generation Sequencing*, que será discutido adiante, são hoje em dia recursos disponíveis para o diagnóstico e possível elucidação das causas genéticas por trás da deficiência intelectual idiopática, sendo também um recurso para a identificação de novos genes associados ao fenótipo de DI. Até o ano passado, cerca de 700 genes, ligados ao X e autossômicos, já haviam sido associados com deficiência intelectual, (VISSERS et al., 2015).

**Tabela 5:** Alguns genes que foram associados a deficiência intelectual antes da era do NGS.

Genes	Tipo de Herança	Referência
BRWD3	XLID	FIELD et al., 2007
CASK	XLID	TARPEY et al., 2009

CC2D1A	ARID	BASEL-VANAGAITE et al., 2006
CDH15	ADID	BHALLA et al., 2008
CRBN	ARID	HIGGINS et al., 2004
DLG3	XLID	TARPEY et al., 2004
DOCK8	ADID	GRIGGS et al., 2008
FGD1	XLID	LEBEL et al., 2002
FMR2	XLID	GECZ et al., 1996 CHAKRABARTI et al., 1996
FOXG1	ADID	SHOICHET et al., 2005
GRIK2	ARID	MOTAZACKER et al., 2007
HUWE1	XLID	FROYEN et al., 2008
KIRREL3	ADID	BHALLA et al., 2008
MBD5	ADID	WAGENSTALLER et al., 2007
MECP2	XLID	AMIR et al., 1999 ORRICO et al., 2000
MED23	ARID	HASHIMOTO et al., 2011
NLGN3	XLID	JAMAIN et al., 2003
OPHN1	XLID	BILLUART et al., 1998
PRSS12	ARID	MOLINARI et al., 2002
SHANK2	ADID	BERKEL et al., 2010
SHROOM4	XLID	HAGENS et al., 2006
STXBP1	ADID	HAMDAN et al., 2009b
SYNGAP1	ADID	HAMDAN et al., 2009a
SYP	XLID	TARPEY et al., 2009

TRAPPC9	ARID	MIR et al., 2009
TUSC3	ARID	GARSHASBI et al., 2008 MOLINARI et al., 2008
UPF3B	XLID	TARPEY et al., 2007
ZC3H14	ARID	PAK et al., 2011
ZNF41	XLID	SHOICHET et al., 2003

## I.5. WES e deficiência Intelectual

Como discutido anteriormente, alterações cromossômicas e mutações em mais de 700 genes já foram associados como causa da DI, porém grande parte dos pacientes ainda permanece sem causa molecular da deficiência intelectual elucidada. Nos casos esporádicos, a situação é complicada pela falta de informação sobre o tipo de herança associado ao fenótipo. O conhecimento da causa do fenótipo, além de trazer conforto para a família, permite detecção de portadores e estimativa de risco de recorrência para aconselhamento genético mais efetivo da família (UHER, 2009; MCCLELLAN; KING, 2010; COLLINS et al., 2011; VAN BOKHOVEN et al., 2011).

O sequenciamento de exoma (metodologia utilizada nesse trabalho), consiste na análise do ~1-3% do genoma que contém informações para a codificação de proteínas e sua implementação na última década levou a um aumento na velocidade de identificação por pesquisadores no mundo todo de novas mutações e novos genes associados a diversas doenças. Em 2010, Lisenka Vissers e colaboradores demonstraram que o WES pode ser utilizado para detectar mutações de novo em casos esporádicos de DI não sindrômica, e também que as mutações de novo eram uma causa comum de DI. Outros estudos (NG et al., 2009; VISSERS et al., 2010) mostraram que existem mais mutações de novo em pacientes com deficiência intelectual do que em controles normais, reafirmando a importâncias dessas mutações. A partir dessas evidências, o sequenciamento de exoma passou a ser usado por pesquisadores no mundo todo, com o objetivo de elucidar a etiologia do fenótipo de pacientes

com DI idiopática (NG et al., 2009; VISSERS et al., 2010; HAMDAN et al, 2011; VELTMAN; BRUNNER, 2012).

O processo de seleção de variantes potencialmente patogênicas em genes ainda não claramente associados a DI deixam uma lacuna entre a detecção de um candidato provável para o fenótipo e a segurança de que o gene é causador do fenótipo. Existem ao menos três estratégias para substanciar o papel de causadora da DI de variantes identificadas por sequenciamento: a primeira delas consiste em encontrar variantes que afetem o mesmo gene em pacientes não relacionados, mas que compartilham o fenótipo; no entanto, além de precisar de vários pacientes com quadro clínico similar, essa abordagem é problemática quando a base genética do fenótipo em questão é heterogênea. A segunda é utilizada em casos esporádicos e consiste em comparar o sequenciamento de exons do paciente com o dos seus pais (análise de trios); esse modelo permite a detecção de variantes de novo em genes dominantes, assim como variantes recessivas autossômicas e ligadas ao X; no entanto, se o gene não for conhecido ou a variante não for claramente patogênica, é difícil que o achado seja considerado inteiramente conclusivo. A terceira estratégia de análise consiste em comparar exomas dos afetados e não afetados em uma família com vários afetados em busca de variante(s) que segregue(m) como o fenótipo. A Figura 1 ilustra as diferentes abordagens. Utilizando essas estratégias de análise do exoma, diversos pesquisadores chegaram ao diagnóstico e à descoberta de novos genes e mutações associados a DI (TOPPER et al., 2011).



**Figura 1:** Estratégias para análise de exoma, a) pacientes não relacionados com o mesmo quadro clínico, b) análise de trio, c) análise familiar. Fonte: figura adaptada de TOPPER et al., 2001.

O sequenciamento do exoma possibilitou um avanço na identificação de genes responsáveis por casos raros de DI (sindrômicos e não sindrômicos), que antes do desenvolvimento da NGS não podiam ser facilmente detectados, devido à impossibilidade de investigar mutações no genoma ou exoma total de pacientes em um único teste (BOYCOTT et al., 2013).

### I.5.1 Sequenciamento de exoma e mutações de novo

A heterogeneidade genética nos casos de DI reduzem a possibilidade de priorizar genes associados a doença na procura de mutações que justifiquem o fenótipo nesses pacientes; como escrito anteriormente, Vissers e colaboradores (VISSERS et al., 2010), através de análise de trios de 10 pacientes, identificaram mutações de novo dominantes preditas danosas em dois genes já associados com DI (*SYNGAP1* e *RAB39B*), e em quatro genes candidatos (*YY1, DEAF1, CIC, DYNC1H1*), entre os quais *DYNC1H1* (WILLEMSEN et al., 2012) e *DEAF1* já foram confirmados como associados a DI através de estudos funcionais (SILFHOUT et al., 2014).

Em 2012, dois estudos confirmaram a importância de mutações de novo em pacientes com DI: nestes estudos duas coortes de 51 (RAUCH et al., 2012) e 100 (DE LIGT, et al., 2012) pacientes com DI grave idiopática (casos isolados) foram submetidos a WES juntamente com seus pais não afetados (análise de trios), revelando que mutações de novo preditas danosas em genes já associados a DI explicam de 13-35% dos casos da forma grave desse fenótipo. Outro estudo realizado com 41 pacientes com DI moderada e grave apresentou uma taxa diagnóstica de aproximadamente 29%, baseada em mutações de novo em genes previamente relacionados com DI (HAMDAN et al., 2014). Em um estudo mais recente, 1133 crianças com DI grave idiopática foram submetidas a análise de exoma juntamente com seus genitores, resultando em taxa de diagnóstico de 18% para mutações de novo em genes conhecidamente associados com DI. A variação nas taxas de detecção é provavelmente decorrente de diferenças em seleção dos pacientes dos diferentes estudos (DECIPHERING DEVELOPMENTAL DISORDERS STUDY, 2015).

# I.5.2 Sequenciamento de exoma e alterações autossômicas recessivas

Nos últimos anos o sequenciamento de exoma também se tornou um método padrão para identificar causas recessivas por trás da DI, resultando na identificação de vários genes. *TERC* foi o primeiro gene onde uma variante em homozigose relacionada com DI foi encontrada utilizando o sequenciamento de exoma, sendo também um dos primeiros genes associados a DI na era de NGS; esse estudo foi realizado em uma família consanguínea com DI não sindrômica (CALISKAN et al., 2011). Outro estudo, de 2012, realizou WES de 19 famílias e detectou alterações *frameshift* em heterozigose composta no gene *DDHD2*, já associado a DI (SCHUURS-HOEIJMAKERS et al., 2012).

Em pequenas famílias no ocidente, onde casamento consanguíneo não é prática comum, a maioria dos pacientes com formas recessivas de DI são casos esporádicos e grande parte dos pacientes com ARID são portadores de mutações em heterozigose composta, ou seja, dois diferentes alelos causadores do fenótipo. Já em populações onde o casamento consanguíneo é comum, as alterações recessivas são a principal causa de DI; um estudo feito em 2015 por Jazayeri e colaboradores utilizando o sequenciamento de exoma para investigar 5 famílias consanguíneas iranianas, com pelo menos dois indivíduos com DI e ataxia, identificaram quatro variantes em homozigose nos genes *RIPPLY1, SNX14, MRPL10, SURF1*, que foram confirmadas e segregavam com os fenótipos em 4 das famílias (RAUCH et al., 2012; MUSANTE; ROPPERS, 2014; JAZAYERI et al., 2015).

### I.5.3 Sequenciamento de exoma e alterações no cromossomo X

Durante muitos anos o estudo do cromossomo X foi privilegiado devido ao excesso de homens com DI em comparação ao número de mulheres, além da facilidade de identificar genes recessivos em hemizigose. Considerando que a prevalência da deficiência intelectual grave é próxima a 0,5%, e que a prevalência de XLDI moderada a severa varia entre 0,05% e 0,08%, é esperado que XLDI seja a causa de 10-16% dos casos de DI severa (ROPERS; HAMEL, 2005); XLID possui uma grande heterogeneidade genética e o sequenciamento

de exons auxiliou na detecção de novos genes e variantes no cromossomo X (NG et al., 2009; BAMSHAD et al., 2011; PHILIPS et al., 2014).Tadmouri e colaboradores em 2013, fizeram o sequenciamento dos exons do cromossomo X de uma irmandade com quatro homens afetados (NS-XLID) e cinco mulheres não afetadas e detectaram uma nova mutação missense no gene *ALG13*, já associado a DI (BISSAR-TADMOURI et al., 2014). Philips e colaboradores em 2014 identificaram em seis famílias, cinco mutações patogênicas em três genes já sabiamente associados com DI (*SLC16A2, GRIA3, DLG3*), e uma em um gene candidato (*ZMYM3*), ainda sem estudo funcional. (PHILIPS et al., 2014).

## I.5.4 Sumário dos achados de WES para elucidar a etiologia da DI

Os benefícios do sequenciamento de exoma são claros, pois em um único experimento é possível obter informações de praticamente toda a região codificadora (região com maior probabilidade de conter mutações que causam doenças), sequenciando uma quantidade muito menor de material que o genoma completo e, consequentemente, com menor custo, menor complexidade de análise e menor necessidade de armazenamento de dados.

A **Tabela 6** apresenta os estudos que foram realizados nos últimos anos utilizando o sequenciamento de exoma para identificar a etiologia da DI em pacientes, as variantes encontradas em genes já sabiamente associados com o fenótipo e também em genes candidatos, incluindo genes autossômicos dominantes, autossômicos recessivos ou presentes no cromossomo X, incluindo casos consanguíneos.

**Tabela 6**: Estudos com sequenciamento do exoma em pacientes com DI semdiagnóstico molecular.

Referência	Tipo de análise	N° de amostras	Genes conhecidos	Genes novos/candidatos
VISSERS et al., 2010	Trio	10	RAB39B, SYNGAP1	DEAF1, CIC, YY1

DE LIGT et al., 2012	Trio	100	ARFGEF2, GRIN2A, GRIN2B, TCF4, TUSC3, SCN2A, LRP2, PDHA1, SLC6A8, TUBA1A, SYNGAP1	DYNC1H1, KIF5C, ASH1L, GATAD2B, CTNNB1, MYT1L, MTF1, ZMYM6
AGHA et al., 2014	Individual	3	-	KMT2B, ZNF589, HHAT
YANG et al., 2014	Individual	2000	SLC2A, ALG12, TTC37, MYO5A, DEAF1	ADCY5, ANKRD11, AP4M1, ASAH1, ATP2B3, CHD2, DYSF
JAZAYERI et al., 2015	Individual	5	RIPPLY1, SNX14, MRPL10, SURF1	-
HU et al., 2016	Família	405	HCFC1, MAOA, CCDC22, USP9X, PIGA, WDR45, KDM6A, BCAP31, ZC4H2, KIAA2022, MID2	CDK16, TAF1, MAGIX, COL4A6

Até o momento, os estudos que foram realizados usando o sequenciamento de exoma para a elucidação das causas de DI, levaram ao diagnóstico de aproximadamente 15-30% dos casos; essa taxa de sucesso pode ser ilustrada por muitos estudos, dentre eles, VoIK e colaboradores em 2014 analisaram 6 trios consecutivos e obtiveram o diagnóstico de 1, resultando numa taxa de 16,6%; Monroe e colaboradores em 2016 fizeram a análise de 17 trios, resultando no diagnóstico de 5 deles (29,4%) (VOLK et al.,2015).

As variantes que são encontradas nesse tipo de sequenciamento são validadas pelo sequenciamento Sanger, porém só uma parte delas são confirmadas; Vissers e colaboradores, por exemplo, só confirmaram 13 (25%) de 51 mutações candidatas (VISSERS et al., 2010). Robinson encontrou 7 variações candidatas a causar o fenótipo ao analisar um trio, 2 delas foram validadas (28%) (ROBINSON et al., 2010). Muitas das mutações não confirmadas representam resultados falso positivos e são decorrentes de artefatos de sequenciamento (DE LIGT et al., 2012; NEED et al., 2012; YANG et al., 2014; SHASHI et al., 2014),

contudo a grande maioria dos autores não detalha a razão de algumas variantes encontradas por eles usando NGS não serem confirmadas por Sanger, ficando ambíguo se a não validação significa que as variantes não eram verdadeiras, ou se apenas não foram testadas. Capítulo II: Objetivos

## II.1. Objetivos gerais

Esse trabalho tem como objetivo identificar novas variantes em genes conhecidos de DI ou mutações em novos genes candidatos que possam explicar a DI idiopática em pacientes esporádicos, através do sequenciamento de exoma dos pacientes e de seus genitores. A síndrome do X frágil e alterações cromossômicas microscópicas/submicroscópicas serão previamente excluídas.

## II.2. Objetivos específicos

- 1. Triar os pacientes com DI para a síndrome do X frágil.
- Nos que não apresentarem alterações no item 1, identificar através de arrays genômicos os pacientes portadores de ganhos e perdas de segmentos de DNA.
- Sequenciar os exomas dos pacientes que não apresentarem alterações nos itens 1 e 2, bem como os de seus genitores.
- 4. Analisar os exomas dos pacientes em busca de variantes que expliquem o quadro clínico, testando as hipóteses de herança autossômica dominante (de novo), herança autossômica recessiva (em homozigose ou heterozigose composta) e ligada ao X recessiva (presente na mãe e no filho afetado).
- 5. Realizar aconselhamento genético das famílias dos pacientes investigados

Capítulo III: Casuística

## **III.1.** Pacientes

Os pacientes foram encaminhados do Serviço de Aconselhamento Genético do IB-USP. Agradecemos à Dr<sup>a</sup> Angela M. Vianna-Morgante, Dr<sup>a</sup>. Ana Krepischi, Dr. Paulo Otto, Dr<sup>a</sup> Débora Bertola, Dr. Fernando Kok, Dr. Eduardo Fusão, Dr<sup>a</sup> Tânia Vertemati, Dr<sup>a</sup> Liane Giuliani, Dr. Marcial Galera, Dr. Juan Llerena Jr., Dr<sup>a</sup> Fabíola Monteiro, Dr. Eduardo Perrone; pela avaliação clínica e encaminhamento dos pacientes.

Foram excluídos do estudo aqueles pacientes do sexo masculino que tiveram resultado positivo para a síndrome do X-frágil; também foram excluídos da casuística aqueles pacientes de ambos os sexos que revelaram desequilíbrios genômicos no teste de *array*-CGH realizado na plataforma 180K da Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA) ou no teste de SNP *array* na plataforma 850K da Illumina (San Diego, Califórnia, EUA).

Todos os pacientes encaminhados para a pesquisa possuem em comum DI limitante (moderada-grave), embora a maioria não tenha sido avaliada por testes de QI. Alguns pacientes apresentavam sinais adicionais, tais como: ataxia, problemas cardiovasculares, catarata, entre outros (a **Tabela 7** sumariza os achados clínicos nos pacientes incluidos na amostra). Os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (**Anexo 1**) concordando com a participação na pesquisa. Foram coletadas amostras de sangue periférico (5-10ml) em tubos com EDTA como anticoagulante dos pacientes e de seus genitores.

rabola r. cindio ciniloco procontos nos pasiones participantos da posquist
--

Pacientes	Sexo	Idade	Sinais clínicos*	Ocorrências durante a gestação
PCGH948	Μ	5 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, cardiopatia congênita, dismorfias faciais.	Restrição de crescimento intrauterino, nascimento prematuro.

PCGH856	F	11 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de linguagem/fala, crises convulsivas, catarata congênita bilateral, hipotonia de membros superiores e inferiores	-
PCGH319	F	6 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia, palato em ogiva, dismorfias faciais, malformação renal e cardíaca.	-
PCGH584	Μ	11 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de linguagem/fala, não anda, encefalopatia crônica não evolutiva, ressonância magnética de crânio normal.	-
PCGH1031	F	5 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia, ptose palpebral, sinofris, prega única de flexão em mão esquerda e parcial em mão direita.	Mecônio na cavidade amniótica
PCGH1005	F	23 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de linguagem/fala, dismorfias faciais, deficiência auditiva bilateral, apêndices pré-auriculares bilaterais, doença renal multicística, cisto aracnoide.	-
PCGH289	Μ	17 anos	Malformações múltiplas, encurtamento proximal dos membros	-
PCGH1454	F	6 anos	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, dismorfias faciais (hipertelorismo, telecanto, epicanto inverso, ponte nasal alargada), atraso no desenvolvimento motor, fala pouco desenvolvida.	-

Capítulo IV: Metodologia

### IV.1. Construção de bibliotecas e sequenciamento dos exomas

As bibliotecas foram construídas usando o kit SureSelect XT ou SureSelect QXT da Agilent Technologies® e o procedimento usado é o descrito pelos fabricantes, como relatado a seguir. Para a construção da biblioteca de exons usamos amostras de DNA extraídas com protocolo fenol:clorofórmio, diluídas na concentração de 200ng de DNA em um volume de 50µl; as concentrações das amostras são mensuradas usando o Qubit (Qubit® 2.0 Fluorometer), e os kits Qubit® dsDNA BR Assay Kit, 100 assays e Qubit® dsDNA HS Assay Kit, 100 assays da Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>). As amostras construídas com o uso do kit SureSelect XT Target Enrichment System for Illumina Paired-End foram submetidas a uma fragmentação mecânica (6 ciclos de 60 segundos) no equipamento Covaris® S2 (Thermo Fisher Scientific). Nesse projeto, utilizamos o equipamento Covaris disponível no CEFAP (Centro de Facilidades para a Pesquisa), centro multiusuário, localizado no prédio do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (USP), campus São Paulo. As amostras que tiveram a biblioteca construída usando o kit QXT passaram por uma fragmentação enzimática, ao invés de mecânica, de acordo com o protocolo.

Para verificar se a fragmentação resultou nos tamanhos de DNA esperados (entre 150 pb a 200 pb) foi usado o equipamento *Bioanalyzer* 2100 com o kit *High Sensitivity DNA assay,* também comercializados pela Agilent technologies®. Deve-se obter um gráfico de distribuição dos tamanhos dos fragmentos semelhante ao das figuras abaixo. A **Figura 2** foi retirada do protocolo e a **Figura 3**, de padrão semelhante, foi obtida no procedimento realizado em nosso laboratório:



Figura 2: Análise do DNA fragmentado usando o *Bioanalyzer*. O eletroferograma mostra a distribuição almejada com um pico entre 120 e 150 pb.



Figura 3: Primeira avaliação da amostra pelo *Bioanalyzer* realizada em DNA de um paciente da coorte, mostrando o pico entre 120 e 150 pb, como exigido pelo protocolo.

Os fragmentos foram então reparados por exonuclease, seguida de fosforilação das extremidades 5' e adenilação da 3', para facilitar a ligação dos adaptadores, que permitirão a ligação aos primers durante reação de PCR. Após a amplificação da biblioteca por PCR, é feita uma segunda verificação de qualidade usando o 2100 *Bioanalyzer*, dessa vez com o kit *DNA 1000 assay;* com a adição dos adaptadores, espera-se encontrar fragmentos maiores, da ordem de 225 pb a 275 pb, como nos gráficos abaixo. A **Figura 4** foi retirada do

protocolo e a **Figura 5**, de padrão semelhante, foi obtida no procedimento realizado em nosso laboratório:



**Figura 4**: Análise do DNA fragmentado usando o *Bioanalyzer*. O eletroferograma mostra a distribuição esperada, com pico entre 225 e 275 pb.



Figura 5: Segunda avaliação de amostra pelo *Bioanalyzer,* realizada em DNA de um paciente da coorte.

A partir desse eletroferograma, pode-se ajustar a concentração de 750ng de DNA em um volume máximo de 3,4 µl. A amostra é então hibridada à biblioteca de captura que consiste em RNAs biotinilados complementares à região de interesse, nesse caso os exons. O DNA capturado por sondas biotiniladas é recuperado por *beads* magnéticas com estreptavidina. A estes fragmentos alvo

recuperados para sequenciamento, são adicionados indexes que permitirão identificar a amostra após o sequenciamento.

Outra verificação de qualidade é feita usando o 2100 *Bioanalyzer* e o kit *High Sensitivity DNA assay.* Nessa etapa é esperado que os fragmentos estejam entre 250 pb a 350 pb, como nas figuras abaixo. A **Figura 6** foi retirada do protocolo e a **Figura 7**, de padrão semelhante, foi obtida no procedimento realizado em nosso laboratório:



**Figura 6**: Análise do DNA fragmentado usando o *Bioanalyzer*. O eletroferograma mostra uma distribuição com pico entre 250 e 350 pb.



Figura 7: terceira avaliação de amostra pelo *Bioanalyzer* realizada em DNA de um paciente da coorte.

Além da avaliação das amostras pelo Bioanalyzer, também é utilizada uma PCR quantitativa usando o sistema MX3005P e o SYBR Green para determinar a concentração de cada biblioteca já com os indexes e ajustar a concentração para produzir um pool de ~10nM de cada biblioteca. O sequenciamento é realizado usando o sequenciador Hiseq 2500 da Illumina pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEPID/FAPESP), do qual a orientadora faz parte. No sequenciamento da Illumina, os fragmentos com adaptadores se ligam através de uma das extremidades a pequenos oligonucleotídeos que estão fixos em uma lâmina. No primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Após 35 ciclos de PCR, são adicionados nucleotídeos diferencialmente marcados com terminadores (impedem a associação de outros nucleotídeos) aos clusters. Quando pareado com sequência complementar, a luz do laser excita o fluorocromo e a imagem é gravada; em seguida o terminador e a fluorescência são retirados para permitir que outro nucleotídeo marcado seja adicionado, e assim por diante até obtermos as sequências de todos os fragmentos. O sequenciador Hiseq 2500 da Illumina possui um maior *output* quando comparado com o Miseq da mesma empresa, chegando a ser 100 vezes maior (1500 Gb); o Hiseq pode gerar até 5 bilhões de *reads* por corrida, o Miseq 25 milhões; o tempo de corrida varia de 7 horas até 6 dias.

Uma revisão do processo de sequenciamento pode ser encontrada em Shendure e Ji (2008)



## Figura 8: Fluxograma da metodologia utilizada nesse projeto

## IV.2. Análise do sequenciamento de exomas

Após o sequenciamento, com o uso do *software* SureCall (Agillent Technologies) os dados dos arquivos Fastq foram alinhados com o genoma de referência (hg19) para identificar possíveis variantes. Segmentos que mapeavam em várias posições no genoma e duplicatas foram filtrados e eliminados (LI et al., 2009). O *software* gera os arquivos SAM (formato de texto que representa o resultado do alinhamento das *reads* contra a referência), BAM (versão binária de SAM que permite a visualização das *reads* mapeadas) e VCF. Os algorítimos utilizados pelo *software* foram BWA-MEM, BWA, TMAP, SamTools.

A qualidade do sequenciamento foi verificada através do programa FastQC, desenvolvido pelo *Brabaham Institute*. Esse programa permite a visualização da qualidade do sequenciamento de bases, conteúdo GC, proporção dos diferentes tipos de nucleotídeos na corrida, tamanho das *reads* geradas, duplicação, e a presença de sequências que se repetem em grande quantidade. Para avaliar a qualidade das amostras através do FastQC, o arquivo BAM foi utilizado.

Os arquivos BAMs foram gerados pelo programa SureCall, e posteriormente eles foram utilizados para gerar o arquivo VCF (texto contendo as variações detectadas em relação ao genoma de referência) para isso foram utilizados
pipelines do SamTools BCFTools disponíveis е no site samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml. O genoma de referência utilizado para alinhamento (Hg19), foi obtido no UCSC genome browser (genome.ucsc.edu). Os arquivos VCF e BAM foram analisados usando o software VarSeg® (Golden Helix), que permite a anotação com vários bancos de dados, os quais compilam informação de freguências populacionais de alelos, patogenicidade de variantes, etc; os bancos utilizados para anotar as variantes foram: RefSeq genes 105, NCBI; NHLBI ESP6500SI-V2 exomes variant frequencies, ClinVar, dbSNP Functional Prediction; OMIM Genes; Ensembl Genes 75,1000 Genome Project; CCDS genes 15; AceviewGenes; ExAC. A Tabela 8, lista quais bancos de dados foram utilizados para fazer filtragem de variantes comuns, anotações de variantes raras, e aqueles que foram consultados para obter informações sobre as variantes.

Além dos bancos de dados, duas ferramentas foram utilizadas para fazer predição do potencial patogênicos das variantes detectadas no sequenciamento: O primeiro deles, o SIFT Prediction (http://sift.jcvi.org/), verifica se a substituição/perda/inserção de nucleotídeo(s) da variante não sinônima detectada afeta a função da proteína; essa ferramenta se baseia na homologia da sequência, propriedades físicas e conservação do(s) aminoácido(s) afetados pela alteração; PolyPhen-2 (Polymorphism 0 Phenotyping v2 http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) prediz 0 impacto de substituição/perda/inserção de nucleotídeo(s) da variante em questão na estrutura e função da proteína, considerando para isso propriedades físicas.

Com base na anotação, as variantes foram filtradas. Como o software VarSeq permite a anotação e filtragem de múltiplas amostras simultaneamente, são analisadas juntamente com as amostras de interesse (trio, pacientes+genitores), outras amostras da mesma corrida de sequenciamento, para filtrar variantes que resultem de artefatos técnicos (presentes em vários indivíduos). Esse programa também provê interface entre as variantes detectadas e sua visualização em *genome browser*.

Através da frequência dessas variantes documentadas em três bancos de dados (1000 genomes, ExAC, NHLBI ESP6500SI-V2), as variantes comuns são

eliminadas, permanecendo aquelas com baixa frequência ou ainda não descritas, ou seja, as variantes raras. As variantes restantes são filtradas com base em região mapeada (exon, região 5', introns, etc), selecionando-se apenas as não sinônimas mapeadas em exons. As variantes também são selecionadas com base em qualidade e cobertura, porém apenas no probando. Na filtragem de qualidade, alguns algoritmos são usados, como o *Phred quality score* e o *genotype quality*, ambos em escala logarítmica e que estimam, respectivamente, as probabilidades do sequenciamento da base e do genótipo estarem corretos.

Parâmetros usados para filtragem:

 Frequência do alelo na população ≤ 0,01 (ExAC, 1000 genomes e o NHLBI ESP6500SI-V2)

 Phred quality score ≥20, o que corresponde à probabilidade de 1 base errada a cada 1000 sequenciadas ou uma acurácia de 99.9%.

 Genotype Quality ≥20, que corresponde a uma probabilidade de 99,9% do genótipo estar correto.

 Cobertura ≥5, que indica pelo menos 5 reads mapeando aquela região onde a variação foi detectada.

Cada trio foi analisado várias vezes, de acordo com diferentes modelos de herança: autossômica recessiva (afetado homozigoto ou heterozigoto composto), autossômica dominante (*de novo* no paciente), ligada ao X recessiva (paciente do sexo masculino, variante herdada da mãe).

As variantes selecionadas foram então avaliadas visualmente nos arquivos BAM do paciente e das outras amostras, de maneira a acessar a qualidade e ruído de sequenciamento da região.

Após essa filtragem, foi feita uma curagem manual com base nas anotações dos genes e consultas adicionais a bibliografia visando relacionar o quadro clínico do paciente com casos anteriormente descritos, estudos funcionais, padrão de expressão do gene e patogenicidade da variante.

Tabela 8: Bancos de dados utilizados para auxiliar na filtragem de variantes



O fluxograma a seguir retrata o esquema utilizado para filtra e analisar as variantes presentes nos arquivos VCF (**Figura 9**):



**Figura 9**: Fluxograma dos passos realizados para filtrar e analisar as variantes detectadas através do sequenciamento de exoma.

As variantes de cada tipo de herança também foram analisada pela ferramenta VarElect (varelect.genecards.org/), que prioriza os genes de acordo com dados fenotípicos usando informações do GeneCards (genecards.org/), PathCards (pathcards.genecards.org/) e MalaCards (malacards.org/), bancos de dados que

contêm informações sobre os genes, sobre as vias em que eles atuam e sobre doenças relacionadas respectivamente; a ferramenta faz uma correlação das informações dos genes indicados com o fenótipo do paciente fornecida pelo usuário, gerando um score de acordo com a probabilidade dos genes estarem associados ao fenótipo inserido. Os genes são separados em duas listas, a primeira daqueles que estão diretamente relacionados com o quadro clínico e a segunda daqueles que são indiretamente relacionados. Os genes que apareciam na lista relacionados ao fenótipo foram então comparados com os que foram selecionados na curagem manual. A partir dessa comparação foram escolhidos os genes para serem confirmados por meio do sequenciamento Sanger.

#### **IV.3. Sequenciamento Sanger**

Os primers específicos para as variações foram desenhados com o auxílio do programa NCBI primer BLAST que utiliza o programa primer3 (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) versão 4.0 e o BLAST desenvolvido pelo próprio NCBI. As sequências de DNA foram obtidas no UCSC (genome.ucsc.edu).

Após desenhados, os primers foram encomendados à Invitrogen<sup>™</sup> da Thermo Fisher Scientific©. Esse sequenciamento também conhecido como método de terminação de cadeia ou sequenciamento didesoxi, se baseia na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, a qual tem como molde a fita 3'-5' do DNA de interesse. Como já discutido na introdução, a adição dos ddNTPs resultando na parada do crescimento da cadeia de DNA, e a detecção das sequências dos fragmentos gerados é possível devido à marcação desses ddNTPs com fluorescência.

O sequenciamento Sanger ocorre em 3 etapas básicas: primeiramente o segmento de DNA no qual a variante mapeia é amplificado por PCR no termociclador (Applied Biosystems).

Na segunda etapa os produtos são purificados para eliminar os reagentes e nucleotídeos não incorporados, Finalmente, os fragmentos amplificados e purificados vão para o sequenciador automático (ABI 3730 DNA *Analyser*), um sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Life

Technologies – Applied Biosystems; as corridas são feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. A fluorescência dos ddNTPs incorporados são excitadas por um laser e captadas por um detector à medida que os fragmentos passam pelos capilares e a informação transmitida para um computador onde é processada.

O sequenciamento resultante do Sanger é analisado usando o programa BioEdit disponível em *mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html*, que permite o alinhamento e manipulação da sequência.

Capítulo V: Resultados

Foram sequenciados os exomas de oito trios (pacientes com DI e genitores não afetados), cujos resultados serão apresentados a seguir.

# V.1. Avaliação da qualidade dos resultados obtidos no sequenciamento de nova geração dos exomas

Antes de serem feitas as análises das variantes, os arquivos BAM de todos os trios tiveram sua qualidade de sequenciamento analisada pelo programa FastQC (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/); exemplos dos resultados obtidos para uma amostra fragmentada mecanicamente e outra por digestão enzimática estão apresentados nas **Figuras 10 e 11**, respectivamente. De acordo com os gráficos obtidos (**Figuras 10A e 11A**), a qualidade das bases sequenciadas em todas as amostras foi classificada como muito boa, uma vez que a média do gráfico (linha azul) se encontra na região verde, que compreende os valores de 28 a > 40 na escala *Phred Score* (phrap.com/phred); esses valores indicam uma acurácia mínima de 99% na identificação das bases. A cor do *background* desse primeiro gráfico divide o eixo y em regiões de boa qualidade (verde), qualidade média (laranja) e baixa qualidade (vermelho); normalmente, a qualidade das bases tente a decair no final da corrida.

Nas **Figuras 10B** e **11B** está ilustrado o baixo nível de duplicação detectado nas amostras, o que reflete uma alta cobertura na região alvo; a linha azul mostra o nível de duplicação em toda sequência; a linha vermelha mostra as sequências após processo computacional de compressão, que leva à eliminação das duplicações. Em bibliotecas com boa qualidade espera-se que variações como pequenos picos, presentes na linha azul, sejam eliminadas na linha vermelha; os gráficos obtidos para nossas amostras obedecem a esse padrão, porém, dada a pequena quantidade de duplicação em nossas amostras, a diferença entre as duas linhas é sutil. A proporção das quatro bases (A, T, G e C) se mostrou adequada, no entanto, as amostras que foram fragmentadas mecanicamente (ex, **Figura 10C**) (kit XT) possuem um menor ruído no início das *reads* quando comparadas com amostras que foram fragmentadas por digestão enzimática (ex, **Figura 11C**) (kit QXT). O programa também detectou o tamanho médio das *reads*, que se encontra entre 100-125 pb, de acordo com o esperado.

**Figura 10**: Qualidade do arquivo BAM de uma amostra (PCGH856) submetido a fragmentação mecânica. A) qualidade das bases, B) nível de duplicação, C) Proporção de bases.



A)

B)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 12-13 18-19 24-25 30-31 36-37 42-43 48-49 54-55 60-61 66-67 72-73 78-79 84-85 90-91 96-97 Position in read (bp)

**Figura 11**: Qualidade do arquivo BAM de uma amostra (PCGH319) submetido a fragmentação enzimática. A) qualidade das bases, B) nível de duplicação, C) Proporção de bases.



A)

B)



Os arquivos BAM e VCF de todos os trios foram analisados com o uso do programa VarSeq (Golden Helix), conforme descrito na metodologia. As variantes anotadas foram filtradas como já descrito, e analisadas de acordo com

os diferentes modelos de herança. Após a filtragem, todos os genes com variantes de novo, em hemizigose, homozigose ou heterozigose composta foram priorizadas de acordo com o fenótipo do paciente através da ferramenta VarElect (varelect.genecards.org/). Com esses dados em mãos e dados clínicos dos pacientes, as variantes foram manualmente curadas com o uso de bancos de dados como OMIM (omim.org/) e GeneCards (genecards.org/) e avaliadas como possíveis candidatas a causar os fenótipos. As reads do BAM foram visualmente avaliadas quanto à qualidade e ao ruído do sequenciamento na região, tanto no paciente em questão quanto nas outras amostras sequenciadas simultaneamente. As variantes que restaram como candidatas para o fenótipo de cada paciente, após confirmação por sequenciamento Sanger, estão apresentadas na Tabela 9; nela encontram-se informações sobre o tipo de mutação, seu efeito, predição das consequências e suas frequências nos bancos de (exac.broadinstitute.org/) dados ExAC 1000 Genomes е (1000genomes.org/index.html).

Tabela 9: variantes potencialmente causativas dos fe	fenótipos dos pacientes analisados
--	------------------------------------

Paciente	Gene	Variação (ref/alt)	Posição	Exon	Padrão de herança	Segregação na família	Predição (SIFT/PolyPhen)	Troca de aminoácido	Número OMIM (gene)	Fenótipo OMIM	Efeito	Impacto da alteração (VEP)	EXAC	dbSNP (ID/ frequência)	ClinVar
PCGH856	TBC1D24	сл	16:2551147	8/3'UTR	Recessivo	Homozigoto com pais portadores	-	-	613577	220500	3' UTR	Modificador	-	rs62040717 / 0.0284/142	-
PCGH948	RYR2	G/A	1:237957254	95	Dominante	De novo, em heterozigose	Provavelmente/ possivelmente danoso	p.Asp4624Asn	180902	600996, 604772	Missense	Moderado	-	-	-
PCGH948	MID1	СЛТ	X:10535359	2	Ligado ao X Recessivo	Hemizigoto, com mãe portadora	Danoso/ provavelmente danoso	p.Val77lle	300552	300000	Missense	Moderado	0,0001	rs143416243 / 0.0003	-
PCGH948	ADAMTSL2	G/A	9:136419629	10	Recessivo	Homozigoto com pais portadores	Tolerado/ benigno	p.Val364lle	612277	231050	Missense	Moderado	-	rs35767802	-
PCGH584	GABBR2	СЛТ	9:101133817	12	-	De novo, em heterozigose	Danoso / benigno	p.Ala567Thr	607340	-	Missense	Moderado	-	-	-
PCGH1454	CDK13	G/C	7:40087439	7	-	De novo, em heterozigose	Danoso / provavelmente danoso	p.Asp855His	603309	-	Missense	Moderado	-	-	-
PCGH1005	DDX3X	T/C	X:41206163	15	Ligado ao X Recessivo/Dominate	De novo, em heterozigose	Danoso / provavelmente danoso	p.Leu556Ser	300160	300958	Missense	Moderado	-	-	-
PCGH1031	NALCN	сл	13:101717778	40	Recessivo/Dominate	Heterozigose composta, pai portador	Danoso / possivelmente danoso	p.Val1528lle	611549	615419 <i>1</i> 616266	Missense	Moderado	8x10-6	rs767980482	-
PCGH1031	NALCN	C/A	13:101721179	38	Recessivo/Dominate	Heterozigose composta, mãe portadora	Danoso / possivelmente danoso	p.Val1400Phe	611549	615419 <i>1</i> 616266	Missense	Moderado	8x10-6	rs771656968	-
PCGH1031	VPS13B	сл	8:100654570	34	Recessivo	Heterozigose composta, pai portador	Danoso	p.Arg1943*	607817	216550	LoF (stop gain)	Alto	-	rs386834099	Provavelmente patogênico (56679)
PCGH1031	VPS13B	C/G	8:100865871	56	Recessivo	Heterozigose composta, mãe portadora	Danoso	p.Tyr3443*	607817	216550	LoF (stop gain)	Alto	-	-	-

LoF= Loss of Function

#### V.2. Resultados obtidos para cada paciente

Durante a análise das variantes dos pacientes, foram detectadas alterações em alguns genes que seriam consideradas candidatas a causar os fenótipos, mas a presença delas em vários trios, incluindo genitores normais, levaram à exclusão dessas variantes, presentes especificamente nos genes: *NBPF8, NBPF20, PCDHGA1, PCDHA1*; alterações nesses genes já haviam sido anteriormente associadas com quadros de atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual.

Todas as variantes em genes candidatos que estão incluídas nesse capítulo foram confirmadas por sequenciamento Sanger, assim como sua presença ou ausência determinada nos genitores. Nos próximos itens, serão mostrados os resultados encontrados e confirmados por sequenciamento Sanger em cada paciente e a presença ou ausência das variantes em seus genitores; no capítulo seguinte será realizada a discussão sobre a associação das variantes detectadas com os fenótipos dos pacientes.

#### V.2.1 PCGH856

O trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect XT da Agilent Technologies® (fragmentação mecânica).

Paciente do sexo feminino, 11 anos, apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de linguagem/fala, hipotonia de membros superiores e inferiores; andou aos 4 anos, apresentou crises convulsivas até os 3 anos de idade e foi medicada com oxcarbazepina até os 5 anos; apresentava catarata congênita bilateral, corrigida através de procedimento cirúrgico. Filha de pais não consanguíneos, mãe não relata anormalidades durante a gestação; avô e bisavô paterno possuem catarata; avó paterna apresenta convulsão, e avô paterno e um primo de quinto grau materno apresentam um quadro de atraso de desenvolvimento.

Ao analisar as variantes de novo nessa paciente foi detectada uma alteração missense em *FOXD4*; genes dessa família já foram associados a alterações de movimento e postura, dificuldade de fala, convulsões e DI; porém a variante só estava presente em duas das 9 *reads* mapeadas na região e as remanescentes continham o nucleotídeo de referência G. Ao ser realizado o sequenciamento Sanger, foi

constatado que essa variante não estava de fato presente na paciente. Também foi detectada uma outra variante candidata a causar o quadro clínico nessa paciente, em homozigose, no gene *TBC1D24*; mutações recessivas nesse gene já foram associadas com DI e quadros convulsivos (BALESTRINI et al., 2016). O arquivo BAM da paciente mostra uma cobertura de 16 *reads*, todos contendo o nucleotídeo T. Os pais são portadores heterozigotos da mutação: na mãe encontra-se 5 dos 7 *reads* com a variante e o pai apresenta 2 dos 10 *reads* com a mutação. A variante foi confirmada por sequenciamento Sanger em homozigose na paciente e em heterozigose em seus pais (**Figura 12**).

A mutação em *TBC1D24* (16:2551147), que está presente na região 3' UTR, não foi classificada pelos algoritmos de predição consultados nesse trabalho; no dbSNP a troca de nucleotídeo C/T foi registrada (rs62040717) com uma frequência de 0,02 e sem descrição de homozigotos; no ExAC não há registro de variações nessa região. Utilizamos o programa *Variant Effect Predictor* (VEP) desenvolvido pelo *Ensembl*, o qual verifica ao fornecermos a posição e a variante, as predições de algoritmos (SIFT e PolyPhen), como também o impacto da alteração, consequente alterações de códons e mudanças de aminoácidos, dentre outros (ensembl.org/info/docs/tools/vep); o VEP classificou o impacto dessa alteração como modificador (**Tabela 9**).

**Figura 12**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 16 contendo a variante do gene *TBC1D24* (16:2551147) detectada em homozigose na paciente PCGH 856 e em heterozigose em seus pais; a) paciente, b) mãe, c) pai.

a)



b)



c)



Foi realizado o sequenciamento Sanger da região da alteração nos pais e na probanda, que confirmou a presença da variante, como mostra a **Figura 13**.

**Figura 13**: Confirmação da variante do gene *TBC1D24* por sequenciamento Sanger no trio PCGH856.a) paciente, b) mãe, c) pai. O sequenciamento mostra ambos os nucleotídeos nos pais (C e T), e a paciente portando apenas o nucleotídeo alterado T em ambos os homólogos, caracterizando homozigose.



#### V.2.2 PCGH948

O trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect XT da Agilent Technologies® (fragmentação mecânica).

Paciente do sexo masculino, 5 anos, apresenta atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, cardiopatia congênita (hipertrofia ventricular, comunicação interatrial), dismorfias faciais, baixo peso ao nascimento (1,300 Kg); começou a andar com 2 anos, não se alimenta sozinho, e apresenta fala pouco desenvolvida. Na trigésima semana de gestação foi detectada restrição de crescimento intrauterino e o feto apresentava tamanho e peso compatível com 27 semanas; o paciente nasceu com 32 semanas de gestação. Ecocardiograma realizado ao nascimento detectou estenose pulmonar valvar moderada, hipertrofia ventricular discreta, disfunção diastólica incipiente, comunicação interatrial do tipo ostium secundum (CIA OS), que afeta a parte medial do septo interatrial. Filho único de pais não consanguíneos, na família do pai há indivíduos com bloqueios cognitivos e ecolalia (afasia); o avô materno é esquizofrênico; aos 5 1/2 anos, o pai informa que o paciente foi diagnosticado com autismo; além desses sinais já relatados a mãe nos informou que o paciente apresentou refluxo; possui criptoquidia esquerda e fimose, ambas corrigidas por cirurgias; é hiper-reativo a estímulos luminosos e sonoros, não apresenta quadros convulsivos.

Três mutações candidatas foram identificadas nesse paciente. Uma variante de novo no gene *RYR2*, cujas alterações já foram associadas ao quadro clínico de cardiomiopatia com herança autossômica dominante; uma outra variante ligada ao X, herdada da mãe, no gene *MID1*, já associado quando mutado à síndrome Opitz, tipo 1, que apresenta quadro clínico com alterações faciais, cardíacas e atraso do desenvolvimento. Dentre as variantes em homozigose, uma única era compatível com o quadro clínico do paciente, no gene *ADAMTSL2* (com pais portadores); alterações nesse gene foram associadas com atraso no desenvolvimento, alterações faciais e cardiovasculares com padrão de herança recessivo. Todas as três alterações encontravam-se com boa cobertura, e foram confirmadas no sequenciamento Sanger.

A alteração encontrada no gene *RYR*2, missense, predita como provavelmente danosa, é uma troca G/A (1:237957254) que não está presente nos pais nem em DNAs de outros indivíduos sequenciados simultaneamente; não há registros no

dbSNP ou ExAC sobre essa alteração; o VEP classificou o impacto dessa troca como moderado (**Tabela 9**). A criança afetada apresenta 114 *reads* no arquivo BAM contendo a troca para adenina e 124 com nucleotídeo de referência (guanina); a mãe e o pai apenas apresentam *reads* contendo guanina (alelo referência), com 226 e 292 *reads* respectivamente (**Figura 14**).

**Figura 14**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 1 contendo a variante do gene *RYR2* (1:237957254) detectada de novo no paciente PCGH 948; a) paciente, b) mãe, c) pai.

a)



c)

PCGH948 Coverage	M_R1_06Nov2015	5_12_19_01_2	44_Sorted.mdu	ıp											PCGH	1948 💼
Depth 200																*
100 Head	Т	Т	С	А	G	А	Α	G	А	Т	G	А	Т	А	Т	-
Pile-up																
300-250-																^
200-											_					
100-																
50-																~

A alteração de novo no gene *RYR2* foi validada por sequenciamento Sanger, como mostra a figura abaixo (**Figura 15**).

**Figura 15**: Confirmação da variante do gene *RYR2* por sequenciamento Sanger no trio PCGH948.a) paciente, b) mãe, c) pai. O sequenciamento mostra a presença da guanina nos pais, e o paciente portando os nucleotídeos A e G, caracterizando heterozigose, de novo.



Na alteração presente no gene *MID1*, ligada ao X, onde o paciente é hemizigoto e sua mãe é portadora, há uma troca C/T (X:10535359), missense, que foi predita como tolerada e provavelmente danosa pelo SIFT e PolyPhen, respectivamente; o VEP classificou o impacto dessa variante como moderado (**Tabela 9**); essa variante está presente tanto no ExAC como no dbSNP com frequência entre 1 e 3 para 10.000 indivíduos (**Tabela 9**). O arquivo BAM, mostra o paciente com 201 *reads* mapeando o T, e 6 *reads* com o nucleotídeo referência (C); a mãe apresenta 134 *reads* contendo a variante e 143 *reads* contendo referência; o pai apresenta apenas o nucleotídeo referência.

**Figura 16**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo X contendo a variante do gene *MID1* (X:10535359) detectada em hemizigose no paciente PCGH 948 e em heterozigose em sua mãe; a) paciente, b) mãe, c) pai.

X: 10,535,36

X: 10,535,362

X: 10,535,

X: 10,535,3

a)

X: 10,535,350

X: 10,535,352

X: 10,535,354

X: 10,535,356

X: 10,535,35

1

٢	PCGH948	HRead1_06N	lov2015_12_	19_01_235	_Sorted.md	dup														PCGH	948 💼
	Coverag td 400 250	e				_															^
	Beat 100 Head	G	Т	А	G	G	G	Т	G	А	Т	G	Т	Т	G	С	G	С	Т	Т	~
	Pile-up																				
ľ	220-							-	-												Â.
	200-							-													=
	180																				
	160-																				
	140														-						-

b)

PCG	H948T_R	1_06Nov2	015_12_19	_01_243_S	orted.mdup	,														PCGH	48 💼
Depth	00																				^
Bead	.00	G	Т	А	G	G	G	Т	G	А	C	G	Т	Т	G	С	G	С	Т	Т	-
Pile	up																				
- 3	00 - 50 -																				^
2	00 - 50 -								-										·		
1	00-																				
	50-1									-											-

c)



A presença da variante em hemizigose no paciente e em heterozigose na mãe portadora, assim como sua ausência no pai, foram confirmadas pelo sequenciamento Sanger, como mostra a figura a abaixo.

**Figura 17**: Confirmação da variante do gene *MID1* por sequenciamento Sanger no trio PCGH948; a) paciente, b) mãe, c) pai. Mostrando ambos os nucleotídeos na mãe (C e T), e apenas o nucleotídeo alterado T no paciente.



Outra alteração que foi encontrada no paciente e considerada candidata a justificar seu fenótipo foi detectada em homozigose no gene *ADAMTSL2*, que está presente no cromossomo 9 (9:136419629), onde ocorre uma troca G/A, missense, com predições de benigna e tolerada; o impacto dessa troca foi classificado como moderado (VEP) (**Tabela 9**). O arquivo BAM do sequenciamento do exoma do paciente possui 55 *reads* que superpõem a variante (adenina); no caso de seus pais, heterozigotos, há uma cobertura de 15 e 27 *reads* mapeando a adenina, e 11 e 28 *reads* contendo guanina (**Figura 18**).

**Figura 18**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 9 contendo a variante do gene *ADAMTSL2* (9:136419629) detectada em homozigose no paciente PCGH 948 e em heterozigose em seus pais; a) paciente; b) mãe; c) pai.

a)



b)



c)

PCGH948M_R1 Coverage	I_06Nov2015	_12_19_0	1_244_Sor	rted.mdup														PCGH	948 💼
the 100 meter																			^
20 - Fridad	А	Т	G	G	G	С	Т	Т	C C	T	С	С	С	G	С	А	С	А	
Pile-up																			
50-									_	_									^
40-																			
30-															·				
10-																			
																			- T

Essa variante foi confirmada por sequenciamento Sanger, como mostra a figura abaixo.

**Figura 19**: Confirmação da variante do gene *ADAMTSL2* por sequenciamento Sanger no trio PCGH948; a) paciente, b) mãe, c) pai. Mostrando ambos os nucleotídeos nos pais (G e A), e o paciente portando apenas o nucleotídeo alterado (A), caracterizando homozigose.



Nesse caso, o Paciente possui três variantes detectadas pelo exoma e confirmadas por sequenciamento Sanger, que são candidatas a justificarem o seu fenótipo.

# V.2.3 PCGH319

O trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect QXT da Agilent Technologies® (fragmentação enzimática).

Paciente do sexo feminino, 6 anos, apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, malformação renal e cardíaca, dismorfias faciais, palato em ogiva e hipotonia; a mãe relata a ocorrência de duas infecções urinárias durante a gestação. A paciente é filha de pais não consanguíneos, sem casos semelhantes na família, possui um irmão normal.

As variantes de novo associadas com o fenótipo foram encontradas nos genes: *GNAQ*, no qual alterações em mosaico já foram associadas ao quadro clínico da síndrome de Sturge-Weber, que possui DI como o principal sintoma; e em *ROCK*2,

que regula divisão celular, contração muscular, formação de fibras de actina e adesão; este gene está relacionado com sinalizações mediadas pelo AMPc e ao desenvolvimento de axônios. Mutação no gene *ROCK2* foi sugerida como provável causa molecular do fenótipo da paciente pela ferramenta VarElect, que o colocou no topo da lista de genes que indiretamente estão relacionados com o quadro clínico, devido à sua interação com os genes *CTNNB1*, *ACTB* e *RAF1*. A troca T/C (9:80537090) encontrada no gene *GNAQ*, *misssense*, sem predição, está presente no BAM com baixa cobertura na paciente (2 *reads*), e os pais não apresentavam a alteração, como mostra a figura abaixo.

**Figura 20**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 9 contendo a variante de novo do gene *GNAQ* (9:80537090), detectada de novo na paciente PCGH 319; a) paciente; b) mãe; c) pai.

a)

$\subset$					9				
		9: 80,537,074	9: 80,537,079	9: 80,537,084	9: 80,537,089	9: 80,537,094	9: 80,537,099	9: 80,537,104	9: 80,537,109
	PCGH319RA	_R1_04Apr2016_15_13_32	_859_Sorted.mdup						PCGH319
	Coverage								*
	Head Anthe	САССТ	ACCTT	АТТGТG	СТСАТА	АСТТС	TATGG	GATCT	TGAGT <del>-</del>
li li	Pile-up								
1	8-								*
	6-		A		C				
	5-4-		A						E
	2-								-

b)



c)

_		
	PCGH1918Q_H1_04Apr2016_15_13_32_875_Sorted.mdup Coverage FCOverage	2CGH319 💼
		~
	и сасстассттатт G Т G C T C A I A C I I G I A I G G G A T C T T G A G	Τ -
	Pileup	
	12-	~
	8-	
	2-	
U		*

A alteração de novo detectada no gene *ROCK*2 é uma troca C/A (2:11351924); no arquivo BAM, a variante se encontrava em 2 *reads* na paciente, enquanto os 8 *reads* remanescentes eram referência. O pai e a mãe só apresentam o nucleotídeo referência (C), com cobertura de 19 e 17 *reads* respectivamente, como mostrado na **Figura 21**.

**Figura 21**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 9 contendo a variante de novo do gene *ROCK2* (2:11351924), detectada de novo na paciente PCGH 319; a) paciente; b) mãe; c) pai.

a)



Ambas as variações nos genes foram observadas em apenas duas *reads* cada, e não foram confirmadas quando realizado o sequenciamento Sanger. Portanto, não foi detectada nenhuma variação em heterozigose, homozigose ou heterozigose composta potencialmente responsável por características clínicas desta paciente,

mesmo após incluir na análise variantes em região 3' e 5' UTR. Portanto, o fenótipo da paciente segue inexplicado.

# V.2.4 PCGH584

Este trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect QXT da Agilent Technologies® (fragmentação enzimática).

Paciente do sexo masculino, 11 anos, apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, sem desenvolvimento da fala; não anda, possui encefalopatia crônica não evolutiva, hipotonia, problemas de sociabilidade, não sabe mastigar, e não apresenta crises convulsivas; foram realizados exames de ressonância magnética (RNM) do crânio, triagem metabólica e erros inatos do metabolismo, todos com resultados normais; a mãe relata infecção urinária, anemia e corrimento durante a gestação. O paciente é filho único de pais não consanguíneos, sem casos semelhantes na família.

Foi confirmada por sequenciamento Sanger uma única variante (de novo) associada com o fenótipo, presente no gene *GABBR2*, que codifica um receptor da família GABA e atua inibindo atividades neuronais. Outras variantes foram detectadas em outros genes, porém elas não foram consideradas candidatas plausíveis para o fenótipo apresentado pelo paciente.

A troca C/T (missense) que ocorre nesse gene (9:101133817) foi classificada como danosa/provavelmente danosa pelos algoritmos de predição, e não há registros dessa ou de outra variação nessa posição nos dados do ExAC e dbSNP; o impacto dessa troca foi considerado moderado pelo VEP (**Tabela 9**). O arquivo BAM mostra o paciente com uma cobertura de 34 *reads* contendo a alteração (T) e 40 com o nucleotídeo de referência (C); a mãe e o pai só possuem o nucleotídeo referência com cobertura de 125 e 102 *reads* respectivamente, como pode ser visto na **Figura 22**.

**Figura 22**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 9 contendo a variante de novo do gene *GABBR2* (9:101133817) detectada de novo no paciente PCGH 584; a) paciente; b) mãe; c) pai.

a)

							9								
∢	9: 101,133,811	9: 101,133,	813	9: 101,133,815		9: 101,133,817		9: 101,133,819		9: 101,133,821		9: 101,133,823	S	: 101,133,825	Þ
PCGH584G.I Coverage	marked.realigned.reca	I												BAM do g	genoma 💼
4 160 T						_									^
Pead Pead	С	A A	А	А	G	c	G	G	Т	С	G	Т	G	Т	
Pile-up															
70-															^
60-															
30-															_
10								1							

# b)

PCGH584R.ma	rked.realigned	.recal												BAM do g	enoma 💼
Coverage															
B 250-															Â
Dg 150	<u> </u>	٨	٨	٨	٨	0		0	0	-	0	0	 0	T	
운 50 킠	C	A	A	A	A	G	C	G	G		C	G	 G		1 -
1 Dile un															
Pile-up															
140-															^
120															
100-															
80-															
60-							-								
40-1															
20-															
U							1								

# c)

ked.realigned.	recal													BAM do ge	enoma 💼
															*
С	А	А	А	А	G	С	G	G	Т	С	G	Т	G	Т	1-
															^
	ked.realigned.	ked.realigned.recal	ked.realigned.rec.al	ked.realigned.recal	ked.realigned.recal	ked.realigned.recal	ked.realigned.recal	ked.realigned.rec.al	ked.realigned.recal	ked.realigned.rec.al	ked.realigned.rec.al	ked.realigned.recal	ked.realigned.recal	ked realigned.recal	ked.realigned.rec.al BAM do g

Essa alteração de novo visualizada no BAM foi confirmada por sequenciamento Sanger, como mostra a figura abaixo, onde o paciente possui ambos os nucleotídeos C e T, e seus país apresentam apenas a citosina na posição.

**Figura 23**: Confirmação da variante do gene *GABBR2* por sequenciamento Sanger no trio PCGH584; a) paciente, b) mãe, c) pai. O sequenciamento mostra a presença da citosina nos pais, e o paciente portando os nucleotídeos C e T, caracterizando heterozigose, de novo.



#### V.2.5 PCGH1454

Este trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect QXT da Agilent Technologies® (fragmentação enzimática).

Paciente do sexo feminino, 6 anos, portadora de atraso no desenvolvimento, dismorfias faciais (olhos com hipertelorismo ocular, telecanto, epicanto inverso, ponte nasal alargada), andou e falou com 2 anos, apresenta fala pouco desenvolvida, perímetro cefálico medindo 50 cm aos 6 anos. Filha de pais não consanguíneos, a gestação ocorreu sem intercorrências, nasceu na 39<sup>a</sup> semana pesando 2,780 Kg e com 48 cm de comprimento, apresentou dificuldade de sucção; a mãe da paciente afirma consumo de bebidas alcóolicas no início da gestação. Foram realizados exames de erro inato do metabolismo, ressonância magnética de crânio, ecocardiograma e ultrassonografia de abdômen, todos com resultados normais; foi diagnosticada com comunicação interatrial (CIA) ao nascimento. O pai possui duas irmãs com quadro de esquizofrenia; a paciente possui um irmão mais novo normal.

Foram encontradas duas variações de novo nos genes: *CDK13*, que atua na divisão celular; e uma deleção no *ADRA1D*, que gera receptores adrenérgicos. Não foi detectada nenhuma variante em homozigose associada com o quadro clínico da paciente, e as variações em heterozigose que foram detectadas não foram consideradas como provável causa molecular do fenótipo. Apenas a variante de novo do gene *CDK13* foi confirmada por sequenciamento Sanger; a alteração do *ADRA1D* 

estava com baixa cobertura (3 *reads*), justificando sua não confirmação por essa mesma metodologia.

A alteração no *CDK13* foi priorizada pelo programa VarElect como uma provável causa do fenótipo da paciente em questão; a atuação desse gene no alongamento axonal já foi relatada (CHEN et al., 2016).

A troca de bases G/C (missense), de novo, detectada nessa paciente (7:40087439), foi predita danosa/provavelmente danosa pelos algoritmos de predição usados nesse trabalho; a troca de nucleotídeos teve seu impacto classificado como moderado pelo VEP, e não há dados dessa variante no ExAC ou dbSNP (**Tabela 9**). A paciente apresentou uma cobertura de 11 *reads* contendo a alteração e 3 *reads* contendo guanina; o pai e a mãe apresentaram apenas *reads* contendo o nucleotídeo G, com 29 e 22 *reads* respectivamente (**Figura 24**).

**Figura 24**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo 7 contendo a variante do gene *CDK13* (7:40087439) detectada de novo no paciente PCGH 1454; a) paciente; b) mãe; c) pai.

a)



b)

					PCGH-1454-MA
					A
G C A	G A	С Т	Т	T G	G .
					A
	G C A	<u>G</u> CAGA	<u>G</u> CAGACT	<u>G</u> CAGACTT	<u>G</u> CAGACTTTG

c)



Essa variante em heterozigose de novo foi validada por sequenciamento Sanger, como mostra a figura abaixo: a paciente apresenta ambos os nucleotídeos C e G, e seus pais apenas guanina.

**Figura 25**: Confirmação da variante do gene *CDK13* por sequenciamento Sanger no paciente PCGH1454 e ausência em seus pais; a) paciente, b) mãe, c) pai. O sequenciamento mostra o nucleotídeo C como referência, nos pais, e o paciente com ambos os nucleotídeos C e G, caracterizando heterozigose, de novo. A figura mostra a fita reverse.



### V.2.6 PCGH1005

O trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect QXT da Agilent Technologies® (fragmentação enzimática).

Paciente do sexo feminino, 23 anos, portadora de atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, dismorfias faciais, apêndices pré-auriculares bilaterais, deficiência auditiva bilateral, hipoplasia renal esquerda secundária a doença renal

multicística; ressonância magnética de cérebro mostrou cisto aracnoide, ecocardiograma normal e triagem de erros inato do metabolismo negativa; mãe relatou icterícia na paciente ao nascimento; filha de pais não consanguíneos e sem casos semelhantes na família.

Foi confirmada uma alteração de novo no gene *DDX3X*, o qual já foi associado a DI ligada ao X, com quadro clínico variável (SNIJDERS BLOK et al., 2015). Não foram detectadas alterações em homozigose em genes com provável correlação com o quadro clínico da paciente; e as alterações em heterozigose composta com provável associação com o fenótipo não foram consideradas causativas.

A troca missense T/C (X:41206163), de novo, em heterozigose, foi predita danosa; o impacto da alteração foi considerado moderado pelo VEP; não há registros dessa variação no ExAC ou dbSNP (**Tabela 9**). No BAM da paciente, há uma cobertura de 53 *reads* mapeando a alteração (C) e 40 *reads* mostrando a presença do nucleotídeo referência (T); a mãe e o pai apresentam somente a base referência (T), com cobertura de 41 e 30 *reads* respectivamente (**Figura 26**).

**Figura 26**: Imagem (arquivo BAM) da região do cromossomo X contendo a variante do gene *DDX3X* (X:41206163) detectada de novo na paciente PCGH 1005; a) paciente; b) mãe; c) pai.

a)



b)



PCGH	1005A.mar	ked.realig	jned.recal													BAM do ge	noma 💼
Depth	age Till																*
Lead 7	- The second sec	А	А	G	G	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	G	G	А	Т	(
Pilea																	
4	5-																*
3	5-		· · · · · ·														
2	5-																
1	5-																
	5-																+

Essa variante foi validada por sequenciamento Sanger, que confirmou a presença do nucleotídeo C em heterozigose apenas na paciente; os pais apresentaram apenas o nucleotídeo referência T, confirmando o status de novo dessa alteração (**Figura 27**).

**Figura 27**: Confirmação da variante do gene *DDX3X* por sequenciamento Sanger na paciente do trio PCGH1005, a) paciente, b) mãe, c) pai. O sequenciamento mostra a presença de ambos os nucleotídeos (Te C) na paciente, e seus pais apresentam apenas a timina.



# V.2.7 PCGH1031

O trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect QXT da Agilent Technologies® (fragmentação enzimática).

Paciente do sexo feminino, 5 anos, portadora de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (sentou sem apoio com 2 anos, andou com 3 anos, não fala), ptose palpebral, epicanto interno bilateral, sinófre, orelhas grandes de implantação baixa, microcefalia (PC 47 cm, <3%), miopia, pouco contato visual, hipotônica na primeira

infância, hipertelorismo mamilar, prega única de flexão em mão esquerda e parcial em mão direita, não possui controle esfincteriano. Filha de pais não consanguíneos; nasceu de parto cesáreo indicado por sinais de sofrimento fetal (eliminação de mecônio na cavidade amniótica); não há casos semelhantes na família. Não foram detectadas variantes de novo ou em homozigose potencialmente associadas com esse fenótipo; duas alterações recessivas, em heterozigose composta, foram consideradas potencialmente causativas do quadro clínico e confirmadas por sequenciamento Sanger, nos genes: *NALCN*, que forma canais catiônicos e atua na condução do sódio no sistema nervoso; e *VPS13B*, que exerce um papel no transporte de vesículas e atua no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso; alterações em ambos os genes já foram associadas a quadros clínicos envolvendo DI.

As duas variantes missense que compõem a heterozigose composta no gene *NALCN* foram preditas como danosas/provavelmente danosas; o impacto das duas variantes foi considerado moderado, de acordo com o VEP, e apresentam frequência menor que 0,01 nos bancos de dados consultados (**Tabela 9**). Na primeira há uma troca de C/T (13:101717778), presente no arquivo BAM da paciente com cobertura de 11 *reads* da base alterada, timina, e 18 *reads* contendo a citosina, que é o nucleotídeo referência; a mãe não apresenta a alteração, e o pai possui 26 *reads* mapeando a variante, e 35 contendo referência (**Figura 28A**). A segunda variação que compõe essa heterozigose composta é uma troca C/A (13:101721179); a paciente possui cobertura de 29 *reads* contendo o nucleotídeo alterado e 24 contendo o nucleotídeo referência; a mãe possui 35 *reads* com adenina e 58 *reads* com citosina, a base referência; o pai não apresenta a variante (**Figura 28B**).

**Figura 28**: Imagens (arquivos BAM) das regiões do cromossomo 13 que contêm as variantes no gene *NALCN* detectadas em heterozigose composta na paciente PCGH1031: a) paciente; b) mãe; c) pai.

A. Variante C/T (13:101717778), herdada do pai.

a)

٢	PCGH103	31_R1_	26Feb201	6_17_59	9_07_94	3_Sorted	d.mdup																	P	CGH1031	fin
	Coverage Htdag Depth 30 10 10 10	C	A	Т	G	G	A	A	G	G	Т	G	A	G	Т	С	G	С	С	G	С	С	A	Т	Т	4 11 1
	Pile-up 35 - 30 - 25 - 20 - 15 - 10 -																I				1		1		,	*
	5-																									÷

b)

PCGH1031K.marked.realigned.recal																			BAM do	genoma	i fill
140 0 100																					*
CATG	G	А	A G	G	Т	G	A	С	G	Т	С	G	С	С	G	С	С	А	Т	Т	-
Pile-up																					
70-																					^
50 - 40																					
30-20-																					
60 - 50 - 40 - 30 - 20 -																					

c)

lo genoma 💼
*
Τ.
*
-
d

# B. Variante C/A (13:101721179), herdada da mãe.

a)

	13:	: 101,721,1	170			13: 101,7	721,175			13 13: 101	721,180			1	3: 101,72	1,185			1	3: 101,721	,190		) ,
Coverage that 100 to 00	C (	G	а _	G	G	С	Т	G	A	A	C	Т	Т	Т	G	G	G	G	С	A	Т	T	^ 
Pile-up 70- 50- 40- 30- 20- 10-			-											· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						,			A T

b)

$\square$	PCGH10	31K.mari	ked.reali	gned.red	al																		BAM do	genom	a 💼
	ttd 160	e																							*
	100 Head	А	С	G	G	А	G	G	С	Т	G	Α	A (	СТ	Т	Т	G	G	G	G	С	А	Т	Т	
1	Pile-up																								
1	80-																								^
	60																								
	40-																								
	20																								-

c)

PCGH1	031A.mar	ked.reali	gned.rec	al																				BAM do	genom	a fill
40 350 0 250																										*
Pe 150	A	С	G	G	Α	G	G	С	Т	G	А	А	С	С	Т	Т	Т	G	G	G	G	С	Α	Т	Т	
Pile-up	_																									
180																										^
140																										
100																		a.								
60-																										
20-																										Ŧ

O sequenciamento Sanger mostrou ambas as alterações na paciente, a primeira herdada do pai e a segunda herdada da mãe, confirmando a presença de heterozigose composta do gene *NALCN* (**Figuras 29A** e **B**).

**Figura 29**: Confirmação por sequenciamento Sanger das variantes no gene *NALCN* presentes em heterozigose composta na paciente PCGH1031; a) paciente, b) mãe, c) pai.

A. Variante C/T (13:101717778), herdada do pai:



B. Variante C/A (13:101721179), herdada da mãe:



A segunda heterozigose composta detectada na paciente, presente no gene *VPS13B*, também foi considerada causa plausível do quadro clínico. A primeira variante, uma troca C/T (8:100654570), classificada como *Loss of function* (LoF), foi predita danosa com impacto considerado alto (VEP), já descrita no dbSNP e também no ClinVar, onde foi considerada provavelmente patogênica (**Tabela 9**). Está presente no BAM da paciente com uma cobertura de 35 *reads* contendo a timina, e 30 contendo a citosina (base referência); a mãe não possui a alteração e o pai apresenta 46 *reads* contendo timina e 48 com citosina (**Figura 30A**). A segunda variação é uma troca C/G (8:100865871), também classificada como LoF, predita danosa; a troca, sem registro nos bancos de dados consultados, foi considerada de alto impacto pelo VEP (**Tabela 9**); o arquivo BAM mostra uma cobertura de 46 *reads* contendo o nucleotídeo G e 44 mapeando a citosina; a mãe apresenta 60 *reads* contendo guanina e 48 com citosina; o pai não apresenta essa segunda variação (**Figura 30B**).

**Figura 30**: Imagem (arquivo BAM) das regiões do cromossomo 8 que contêm as variantes no gene *VPS13B* detectadas em heterozigose composta na paciente PCGH 1031; a) paciente; b) mãe; c) pai.
# A. Variante C/T (8:100654570), herdada do pai:

a)



b)



c)



B. Variante C/G (8:100865871), herdada da mãe:

a)



Γ	PCGH1031K.mar	rked.realig	ined.rec	al																			BAM do	genom	a fill
	Coverage 4 0 150-																								*
	50 G	Т	Т	Т	G	А	Α	С	Т	Т	Т	A G	Т	G	Т	G	Т	G	G	А	G	А	Т	Ç	÷
1	Pile-up																								
1	140-																								ŕ
	100																								
	60 - 1 - 1 - 20 -								_												-				

c)



O sequenciamento Sanger confirmou a heterozigose composta do gene *VPS13B* detectada por sequenciamento de exoma da paciente PCGH1031, a primeira variante herdada do pai (**Figura 31A**) e a segunda da mãe (**Figura 31B**).

**Figura 31**: Confirmação por sequenciamento Sanger de presença de heterozigose composta do gene *VPS13B* na paciente PCGH1031; a) paciente, b) mãe, c) pai.

A. Variante C/T (8:100654570), herdada do pai:



B. Variante C/G missense (8:100865871) herdada da mãe.



Portanto, essa paciente apresenta dois genes com alterações em heterozigose composta, candidatos a explicar seus sinais clínicos.

# V.2.8 PCGH289

O trio foi sequenciado usando o Kit SureSelect QXT da Agilent Technologies® (fragmentação enzimática).

Paciente do sexo masculino, 17 anos, apresenta atraso do desenvolvimento, malformações múltiplas mínimas, e encurtamento proximal dos membros, de acordo com o relato médico presente em sua ficha; mãe não relata anormalidades durante a gravidez. Filho de pais não consanguíneos e sem casos semelhantes na família.

Na análise dos exomas do paciente e de seus pais, não foi detectada nenhuma alteração de novo, em homozigose, ou ligada ao X que justificasse o fenótipo em questão; em heterozigose composta, foi identificada uma alteração no gene *HSPG2*, já associado quando mutado com a síndrome de Schwartz-Jampel de herança recessiva, cujos portadores apresentam baixa estatura, catarata, cifose, lordose, epífises femorais com fissura, luxação congênita do quadril, metáfises alargadas, arqueamento anterior dos ossos longos, contraturas nos pulsos e dedos, hirsutismo generalizado, miotomia, hipertrofia muscular, miopatia miotônicas e, em 25% dos

casos, deficiência intelectual. Essa síndrome está associada com alta mortalidade (SPRANGER et al., 2000).

As alterações nesse gene foram preditas como tolerada e benigna, pelos algoritmos de predição utilizados nesse projeto. Adicionalmente, a descrição clínica do paciente não é compatível com as características dessa síndrome descritas na literatura em geral e, em particular, no OMIM. Concluímos que as variantes em heterozigose composta do gene *HSPG2* não são explicação provável para o quadro clínico desse paciente. Também não detectamos alterações potencialmente causativas em nenhum gene candidato quando incluímos regiões 3' e 5' UTR. Portanto, não temos variantes em genes candidatos a explicar o quadro clínico desse paciente.

Capítulo VI: Discussão

A deficiência intelectual é a razão mais frequente de procura de aconselhamento genético pelas famílias. Até ~15 anos atrás, eram realizados exames de cariótipo, triagem metabólica e fra(X), que elucidavam a causa da DI em no máximo 40% dos casos; com o surgimento de *array*s genômicos, a causa molecular por trás de outros ~20% dos quadros de DI foram elucidados, descobrindo nesse processo novas mutações e genes associados com o fenótipo. Porém, mesmo com esse avanço, muitos pacientes ainda permanecem sem causa molecular clara que justifique o fenótipo. O uso de *Next Generation Sequencing*, que foi discutido e utilizado nesse trabalho, é hoje um dos recursos disponíveis para o diagnóstico e possível elucidação de causas genéticas por trás da deficiência intelectual idiopática, sendo também um recurso para a identificação de novos genes associados ao fenótipo de DI (MOESCHLER; SHEVELL, 2006; RAUCH et al., 2006; KRIEK et al., 2007).

Usando o sequenciamento de exoma (WES), é possível, em um único experimento, obter informações de praticamente toda a região codificadora (região com maior probabilidade de conter mutações que causam doenças), sequenciando uma quantidade muito menor de material que o genoma completo e, consequentemente, com menor custo, menor complexidade de análise e menor necessidade de armazenamento de dados (KIEZUN et al., 2012). Por apresentar estas vantagens, essa técnica de NGS foi escolhida por nós para tentar elucidar as causas de DI em casos encaminhados para fazer *array* CGH no nosso laboratório e que não tiveram alterações em número de cópias de segmentos de DNA detectadas.

Até o momento, os estudos que foram realizados usando WES para a elucidação das causas de DI, levaram ao diagnóstico de 15-30% dos casos; essa taxa foi ilustrada através de vários estudos mencionados na introdução dessa dissertação.

Foram analisados, nesse projeto, um total de 8 trios, compostos por pacientes que tinham em comum deficiência intelectual, acompanhada ou não de outros sinais clínicos, e seus respectivos genitores; esses pacientes foram previamente triados para a síndrome do X frágil e submetidos ao exame citogenético de *array* CGH, ambos com resultados negativos. A realização do sequenciamento de exoma levou à detecção em 7 pacientes de 15 alterações candidatas em 13 genes, a grande maioria deles já previamente associados com DI; algumas alterações foram detectadas em genes que até hoje não têm sua associação com DI esclarecida, mas que foram considerados

candidatos durante nossa análise. Como esse trabalho é pioneiro em WES em nosso laboratório, não estava inicialmente claro que parâmetros deveriam ser usados para que uma variante fosse considerada provavelmente verdadeira, por isso decidimos a princípio utilizar um filtro que eliminava apenas as regiões que possuíam uma cobertura total menor que 5 *reads*, como já explanado na metodologia. Das 15 alterações selecionadas que foram detectadas durante a análise de exomas, 4 não foram confirmadas pelo sequenciamento Sanger. Avaliando retrospectivamente, fica claro que as variantes com baixa cobertura, no caso abaixo de 10 *reads* na região ou menos que 5 *reads* cobrindo a variante no paciente, não foram validadas por esse sequenciamento. As variantes que foram confirmadas por sequenciamento Sanger apresentavam uma cobertura do nucleotídeo alterado que variava de 11 a 201 *reads*.

Ao final desse projeto, podemos observar que quando o sequenciamento de nova geração nos fornece alterações com uma boa qualidade de mapeamento, acima de 10 *reads* na variante, a alteração está realmente presente nos portadores. Se a experiência no futuro próximo confirmar esses achados, será possível dispensar confirmação de variantes detectadas em WES por sequenciamento Sanger; não está claro se aquelas com cobertura baixa (<10 *reads*) precisam ser confirmadas por outra metodologia ou deverão apenas ser descartadas. Outra adaptação que pode ser feita em estudos futuros, é aumentar o filtro de *reads* cobrindo a região para ≥10, filtro mínimo adotado por vários trabalhos que usam WGS e WES, priorizando a detecção de variantes verdadeiras.

Dentre os 8 trios encaminhados para esse sequenciamento, em dois não foi possível a identificação de nenhuma causa molecular candidata a explicar o fenótipo. No paciente PCGH319, foram detectadas por WES duas alterações de novo com possível relação com o quadro clínico exposto, porém elas não foram confirmadas quando realizado o sequenciamento Sanger. O segundo paciente no qual não foi detectada alteração que justificasse o fenótipo foi PCGH289; o paciente em questão, além da DI, apresentava malformação e encurtamento de membros; foi detectada uma heterozigose composta no gene *HSPG2,* associado com a síndrome de Schwartz-Jampel porém, além das alterações terem sido preditas como benignas/toleradas, os sintomas dos portadores não eram compatíveis com os de nosso paciente e, portanto, as mutações não foram consideradas causa provável do seu fenótipo. Apesar de a princípio excluirmos as variantes nas regiões 3' e 5' UTR, elas foram analisadas

114

quando não encontrávamos nada compatível com o quadro clínico do paciente, porém nesses dois pacientes essa análise tampouco revelou alterações que justificassem os fenótipos.

É possível que alterações em introns ou outras regiões não codificantes sejam responsáveis por esses fenótipos. Tais variantes seriam detectáveis em um sequenciamento de genoma completo (WGS), que possui uma maior taxa de diagnóstico de DI quando comparado ao sequenciamento de exoma (GILISSEN et al., 2014). Há trabalhos que indicam que os uso de WGS é mais eficiente que WES mesmo para detecção de regiões exônicas, por prover cobertura mais uniforme. Um estudo realizado por Yuen e colaboradores utilizou o WGS para detectar alterações em 200 pacientes com autismo idiopático e em seus pais normais (análise de trio); eles detectaram 244 variantes de novo consideradas danosas, 38% delas estavam localizadas em regiões não codificantes, especialmente em sítios de splicing, e região 5' e 3' UTR; eles estimaram que essas variantes danosas detectadas em regiões codificantes e não codificantes levavam à justificativa do fenótipo de aproximadamente 45% dos casos. Além do WGS, eles realizaram a avaliação do perfil de metilação em 185 probandos, em busca de alterações epigenética que justificassem o fenótipo de autismo nesses indivíduos; foram identificadas duas alterações epigenéticas com provável correlação com os quadros (YUEN et al., 2016).

Ferreira e colaboradores mostraram que a junção do sequenciamento do genoma com o sequenciamento do RNAm pode levar à elucidação de variantes causativas de fenótipo; a utilização de ambas as técnicas permite a identificação de alterações em elementos funcionais associados ao RNAm e em sítios de *splicing*; o banco de dados de RNA Geuvadis (geuvadis.org), utilizado nesse trabalho, informa que 22% dos sítios de *splicing* com variantes genéticas possuem seu potencial de atividade alterado (FERREIRA ET AL., 2016).

Além da pequena cobertura que o WES possui em regiões não codificantes, a grande maioria de todos os estudos que usam WES e WGS para elucidar causas moleculares de DI, usam *pipelines* que priorizam a detecção de variantes que obedecem a padrão de herança mendeliano, assim como foi feito no nosso projeto (DE LIGT et al., 2012; RAUCH et al., 2012; YANG et al., 2014; WRIGHT et al., 2015); raros estudos consideram mutações em genes imprintados como possíveis causas do quadro de DI,

por serem mais raros em comparação com as variantes mendelianas. Um dos únicos estudos que desenvolveu uma *pipeline* para considerar variantes imprintadas foi realizado por Bodian e colaboradores, que fizeram O WGS de paciente com DI e seus pais normais (análise de trio) e desenvolveram uma nova abordagem bioinformática para detectar variantes em genes imprintados. O probando já tinha passado por vários exames para diagnóstico molecular, sem resultado; nesse estudo foi detectada uma variante em um gene conhecidamente sujeito a *imprinting*, o *CDKN1C*, considerada causativa do quadro clínico (BODIAN et al., 2014). Mais recentemente, Aten e colaboradores detectaram uma variante causativa através do WES no gene imprintado *MAGEL2*, em pacientes com DI pertencentes a uma mesma família; eles relatam que a descoberta de tal alteração só foi possível devido à extensa genealogia dessa família (ATEN et al., 2016).

Portanto, nos dois probandos que não tiveram a causa molecular do fenótipo elucidada, a realização de sequenciamento de genoma, isolado ou associado ao sequenciamento de RNAm, pode resultar na detecção de variantes causativas com potencial patogênico, que estejam localizadas em regiões reguladoras, intrônicas ou em sítios de *splicing*. A realização do perfil de metilação também pode levar à elucidação desses casos. Outro fator a ser considerado para esses pacientes que não obtiveram diagnóstico, é o uso de novas *pipelines* que considerem variantes em genes imprintados durante a análise.

Dos 8 probandos, em 5 (PCGH948, PCGH1005, PCGH1031, PCGH584, PCGH1454) obtivemos alterações de sequência que representam causa provável dos quadros apresentados, todas em genes com associação demonstrada, ou ao menos sugerida, com deficiência intelectual. No próximo tópico encontra-se a discussão dos pacientes nos quais foram detectadas por WES e confirmadas por sequenciamento Sanger alterações que potencialmente justificam os fenótipos dos pacientes.

VI.1. Pacientes nos quais foram detectadas mutações potencialmente causativas.

#### V.1.1 PCGH856

Na paciente desse trio, 11 anos, foi detectada uma única variante potencialmente causativa do fenótipo, em homozigose, no gene *TBC1D24*, com pais portadores, compatível com herança recessiva; alterações nesse gene já foram consideradas causa molecular de sinais clínicos como atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, atraso do desenvolvimento da linguagem, hipotonia de membros superiores e inferiores, crises convulsivas, e catarata, sinais que estão presentes na paciente.

O gene *TBC1D24*, codifica uma proteína que contém o domínio proteico TBC (Tre2/Bub2/Cdc16), o qual é reconhecidamente conservado e contém aproximadamente 200 aminoácidos. Existem 42 tipos de TBC, e eles possuem atividade GTPase, que modula a atividade de proteínas Rab. As proteínas Rab atuam associadas com outras moléculas proteicas no transporte de vesículas, e circulam entre o citosol e membrana. A Rab na sua forma inativa (Rab/GDP) permanece no citosol; na sua forma ativa (Rab/GTP) sofre uma mudança de conformação e se liga à membrana de uma vesícula de transporte, promovendo a fusão dessa com a membrana da célula. O TBC codificado pelo gene *TBC1D24*, é uma das proteínas que atuam regulando esse processo; sua proteína ainda contém um domínio TLC que atua no estresse oxidativo. A maior expressão desse gene é no cérebro, onde ele atua regulando o tráfego de vesículas sinápticas (CORBETT et al., 2010a, 2010b; CAMPEAU et al., 2014; BALESTRINI et al., 2016).

Mutações recessivas em *TBC1D24* são reconhecidamente a causa de parte dos casos da síndrome de DOOR, também conhecida como síndrome das portas abertas, caracterizada por 5 sinais clínicos clássicos: deficiência intelectual, surdez, alterações ósseas, convulsões e atraso no desenvolvimento; além dessas características, os indivíduos portadores da síndrome podem apresentar microcefalia, catarata, alterações faciais, dentre outras. Vários estudos já tiveram como alvo pacientes com síndrome de DOOR; Felix e colaboradores detectaram 3 casos dessa síndrome em crianças brasileiras que, exceto pelas alterações ósseas, apresentavam os sinais

clássicos da patologia; um dos pacientes apresentava alterações cardíacas (FELIX et al., 2002). Mihci e colaboradores detectaram alterações nesse gene em pacientes com os 5 sinais clássicos da síndrome de DOOR e que também apresentavam atraso no desenvolvimento da linguagem (MIHCI et al., 2008). Campeau e colaboradores reportaram mutações *missense* e *frameshift* em homozigose e heterozigose composta em *TBC1D24*, em pacientes com os 5 sinais clássicos de DOOR (CAMPEAU et al., 2014).

Alterações em homozigose e heterozigose composta no TBC1D24, também já foram associadas com outros quadros clínicos, como: epilepsia mioclônica infantil familiar, onde os portadores apresentam convulsões mioclônicas acompanhadas de atraso motor, atraso no desenvolvimento da fala e DI (OMIM\*605021); e encefalopatia epiléptica infantil (OMIM\*615338). Vários trabalhos também já relacionaram mutações em homozigose ou heterozigose composta no TBC1D24 como causa molecular de quadros clínicos de pacientes que apresentam apenas DI e convulsão (CORBETT et al., 2010a, 2010b; AFAWI et al., 2013). Em trabalho mais recente, pesquisadores reafirmaram a associação de mutações nesse gene com quadros de DI e crises convulsivas variáveis; esse trabalho, desenvolvido por Balestrini e colaboradores estudou mutações nesse gene em 48 pacientes (28 homens e 20 mulheres), que possuíam fenótipos variáveis de convulsão; desses 48 pacientes, 39 apresentaram DI e atraso no desenvolvimento, variando de moderado a profundo. Além desses sintomas, alguns pacientes desse estudo ainda apresentavam hipotonia muscular, alterações cerebrais como atrofia cerebelar, e alterações físicas, onde a mais comum era a ponte nasal alargada; os fenótipos mais severos detectados entre os pacientes estavam associados a mutações nonsense, frameshift ou em sítios de splicing (BALESTRINI et al., 2016).

A troca de nucleotídeos C/T, detectada em *TBC1D24*, não está presente no banco de dados ExAC, mas encontra-se registrada no dbSNP com frequência de aproximadamente 0,02 (rs62040717) (**Tabela 9**), embora indivíduos homozigotos não tenham sido referidos; apesar da frequência dessa troca ser considerada alta para uma alteração rara, a ausência em outros bancos de dados nos fez considerá-la uma variante potencialmente causativa; seu impacto foi classificado como modificador pelo VEP, mesmo na ausência de predições pelo SIFT e PolyPhen.

Essa variante em homozigose encontra-se em uma região 3' UTR, não traduzida, e havia sido inicialmente excluída da nossa lista de possíveis variantes causativas; porém, após a exclusão da única outra variante candidata devido à não confirmação por sequenciamento Sanger, a variante em homozigose no gene TBC1D24 foi incluída na lista de possíveis causas. Para incluí-la, foi levado em consideração principalmente a semelhança do quadro clínico da paciente e dos indivíduos que possuem alterações nesse gene, incluindo hipotonia de membros superiores e inferiores, crises convulsivas, deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento da fala e catarata congênita; porém, foi também considerado o fato de mutações em região 3' não traduzidas já terem sido consideradas hotspot para doenças associadas a outros genes, uma vez que essas regiões podem conter elementos regulatórios para a expressão apropriada do gene. Por exemplo, Reamon-Buettner e colaboradores, descobriram que a região 3' UTR não traduzida do gene GATA4 era um hotspot para mutações causativas de doenças cardíacas congênitas; nesse estudo foi verificado que as alterações nessa região afetavam o dobramento do RNA (REAMON-BUETTNER et al., 2007). Além disso, Balestrini e colaboradores já tinha detectado mutações em sítios de splicing no gene TBC1D24, que foram consideradas responsáveis por quadros de convulsão e DI (BALESTRINI et al., 2016). Por esses motivos, a variante detectada em homozigose na nossa paciente foi considerada como possível causa molecular responsável pelo seu quadro clínico.

Após todas essas considerações, quando esta tese já estava praticamente concluída, o site ABraOM (http://abraom.ib.usp.br/), que contém variantes brasileiras derivadas de ~600 exomas, mostrou uma frequência para essa variante de 0,07, incluindo 10 homozigotos. Nesse momento, somos obrigados a considerar que esta variante é provavelmente um polimorfismo relativamente frequente na população brasileira; essa experiência indica que nossos critérios de patogenicidade devem ser mais estringentes.

#### VI.1.2 PCGH948

No paciente desse trio, 5 anos, foram detectadas alterações em três genes com possível relação com o quadro clínico; no gene *RYR2,* encontramos uma alteração em heterozigose, supostamente dominante, de novo; em *MID1,* localizado no

cromossomo X, foi detectada uma variante em hemizigose; a mãe do paciente é portadora da alteração, padrão compatível com herança recessiva ligada ao X; e no gene *ADAMTSL2*, encontramos uma alteração em homozigose; os pais são portadores heterozigotos dessa mutação, segregando então como um padrão de herança autossômica recessiva. As alterações nesses genes foram inicialmente consideradas candidatas a justificar o fenótipo do paciente, uma vez que mutações neles já foram associadas como causa molecular de sinais clínicos como atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, cardiopatia congênita, dismorfias faciais, criptoquidia, refluxo, e características autistas, sinais que estão presentes no paciente.

Foi detectada na análise do exoma do paciente uma mutação missense de novo no gene *RYR*2, o qual codifica um receptor denominado rianodina 2, que faz parte de uma classe de canais de cálcio presente no miocárdio (ZUCCHI; RONCA-TESTONI, 1997). Alterações dominantes em *RYR*2 podem causar taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) (OMIM\*604772), uma doença arritmogênica genética grave caracterizada por taquicardia ventricular induzida adrenergicamente (VT); alterações nesse gene também são responsáveis por displasia arritmogênica do ventrículo direito (DAVD) (OMIM\*600996) e por outras cardiomiopatias (TISO et al., 2001; BENKUSKY et al., 2004).

Essa mutação foi predita como provavelmente/possivelmente danosa pelo PolyPhen e seu impacto predito como moderado pelo VEP. Essa variante poderia então ser considerada candidata a justificar alterações cardíacas, porém não explicaria os outros sinais clínicos do paciente. Adicionalmente, a anomalia cardíaca apresentada por nosso paciente é hipertrofia do miocárdio e comunicação interatrial, que não está no espectro de alterações causadas por *RYR*2.

Nesse mesmo paciente, também detectamos uma mutação em homozigose no gene *ADAMTSL2*, o qual codifica um membro da família de proteínas ADAMTS, enzimas com um domínio principal de metaloprotease, que confere uma atividade catalítica dependente de zinco; além de atuar na renovação da matrix extracelular e no desenvolvimento embrionário, as enzimas dessa família ainda possuem um domínio secundário de ligação a trombospondina tipo 1, que atua na migração e proliferação celular durante a embriogênese. Essa proteína é secretada como glicoproteína que

se liga à superfície celular e a matrix extracelular; a maior expressão desse gene ocorre no coração (HALL et al., 2003b).

Mutações bialélicas nesse gene foram detectadas em pacientes com displasia geleofísica (OMIM\*231050), doença rara, autossômica recessiva, que causa sobretudo anomalias esqueléticas e de tecido conjuntivo, incluindo: baixa estatura grave, idade óssea atrasada, braquidactilia e ossos longos tubulares encurtados. Características adicionais incluem alterações cardíacas, como espessamento valvular, hepatomegalia, atraso no desenvolvimento (em aproximadamente 30% dos pacientes) e convulsões. Até agora, menos de 30 mutações foram descritas nesse gene (revisão em MACKENROTH et al., 2016). Vários estudos detectaram mutações recessivas (homozigose ou heterozigose composta) no gene *ADAMTSL2* em pacientes com o quadro clínico de displasia geleofísica, provenientes de famílias consanguíneas e não consanguíneas; as mutações detectadas foram classificadas como missense ou nonsense, e as predições por diferentes algoritmos das variantes missense confirmaram patogenicidade e, portanto, essas alterações foram consideradas causativas dos fenótipos (LE GOFF et al., 2008; ALLALI et al., 2011; MACKENROTH et al., 2016).

No nosso paciente, a alteração missense em homozigose no gene *ADAMTSL2*, não foi inicialmente descartada como potencialmente causativa devido à presença de anomalia cardíaca e DI, porém anomalias esqueléticas não foram reportadas em nosso paciente. Essa alteração foi predita por SIFT e PolyPhen como benigna e tolerada, respectivamente; o impacto da variante foi predito moderado pelo VeP. Apesar da predição benigna, não excluímos a variante da lista daquelas candidatas, embora a associação do gene com o quadro clínico do paciente seja insatisfatória.

A terceira alteração detectada nesse paciente encontra-se no gene *MID1*, que codifica uma proteína denominada midline1, que faz parte de uma família de proteínas com capacidade de ligação ao DNA. A proteína midline1 se associa aos microtúbulos, onde exerce um papel de ubiquitina E3 ligase regulando a degradação da fosfatase 2A, a qual é importante na regulação de eventos durante o início da mitose, e participa da integridade do citoesqueleto e motilidade celular. Além de contribuir na regulação da função e constituição do citoesqueleto, ela está relacionada diretamente com o desenvolvimento da linha média embrionária e atua regulando o desenvolvimento de axônios; nos tecidos fetais a maior expressão é encontrada nos rins, cérebro e pulmões; e no tecido adulto no coração e cérebro (PERRY et al., 1998; DE FALCO et al., 2003; LU et al., 2013).

Mutações recessivas no gene MID1 já foram associadas com parte dos casos da síndrome de Opitz G/BBB, que desde as primeiras descrições foi caracterizada como uma síndrome que causa alterações ao longo da linha média do corpo. A sigla G/BBB representa as iniciais das famílias que foram primeiramente diagnosticadas com essa Indivíduos com essa síndrome apresentam alterações faciais condição. (hipertelorismo, ponte nasal larga, lábio superior fino, dentre outros); defeitos na laringe, traqueia e esôfago; hipospádia, criptoquidia, e outras alterações no trato geniturinário. O atraso de desenvolvimento e deficiência intelectual estão presentes em aproximadamente 50% dos indivíduos afetados; entre outras malformações que estão presentes em menos de 50% dos pacientes, estão os defeitos cardíacos congênitos (defeitos do septo ventricular, defeito do septo atrial, dentre outros) e a fenda palatina. Essa síndrome apresenta uma grande variabilidade clínica, podendo os sintomas serem variáveis até mesmo entre membros afetados de uma mesma família (DE FALCO et al., 2003; PINSON et al., 2004). Muitos pacientes com essa síndrome apresentam características do espectro autista, caracterizada por comprometimento da habilidade de comunicação e socialização (CASANOVA E.; CASANOVA M., 2014).

Mutações novas no *MID1* são frequentemente descobertas e associadas com a síndrome de Opitz G/BBB; variabilidade fenotípica também já foi reportada por vários pesquisadores que estudaram pacientes com essa síndrome. Nos estudos realizados com portadores da síndrome foram detectadas várias alterações recessivas, novas ou já registradas em banco de dados, que foram classificadas como *missense, nonsense, frameshift* e em sítios de *splicing*. Os sinais clínicos apresentados variam de um paciente para outro e a maioria dos estudos realizados relata que o hipertelorismo é a única característica clínica compartilhada por todos os pacientes; outras características frequentes são a dificuldade de alimentação devido a defeitos traqueoesofágicos, atraso no desenvolvimento, dificuldade de aprendizagem, e hipospádia (DE FALCO et al., 2003; PINSON et al., 2004; FERRENTINO et al., 2007). Também já foi demonstrado que as mães de pacientes com essa síndrome que possuem a alteração em heterozigose, geralmente apresentam hipertelorismo (SO et

al., 2005). Mais recentemente Ji e colaboradores reportaram a identificação de uma mutação nova, missense, no exon 8 (c.1561C>T) do gene *MID1* em um paciente com Opitz G/BBB; ele apresentava hipertelorismo, fenda palatina, alteração na laringe, e defeito no septo atrial; sua avó era portadora, não afetada, e a mãe portadora levemente afetada, apresentando hipertelorismo ocular (JI et al., 2014).

A alteração que detectamos no gene *MID1* foi, portanto, considerada como a provável causa molecular por trás do quadro clínico do paciente, que apresenta sinais compatíveis com a síndrome de Opitz G/BBB, incluindo: deficiência intelectual, hipertelorismo, criptoquidia, malformação cardíaca e características autistas; nessa variante ligada ao X, onde o paciente é hemizigoto e sua mãe é portadora da alteração, a troca missense foi predita como danosa e provavelmente danosa pelos algoritmos SIFT e PolyPhen, respectivamente, e com impacto moderado de acordo com VEP. Essa variante já foi descrita nos bancos de dados dbSNP e ExAC com frequências entre 1 e 3 a cada 10.000 indivíduos, embora esteja ausente em ~600 exomas de indivíduos brasileiros (http://abraom.ib.usp.br/). Assim, a semelhança do quadro clínico do nosso paciente com o daqueles afetados por mutações em *MID1* associada à predição de provável impacto da variante fez com que considerássemos a variante nesse gene como principal candidata a justificar o fenótipo do paciente.

Em conclusão, a variante que parece melhor explicar o quadro clínico do paciente, além de ser substanciada pela predição é a alteração no gene *MID1*.

#### VI.1.3 PCGH584

No paciente desse trio, 11 anos, a análise do exoma detectou uma mutação de novo, em heterozigose no gene *GABBR2*, que consideramos candidata a justificar o fenótipo em questão, uma vez que mutações nesse gene já foram associadas como causa molecular de sinais clínicos como atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, encefalopatia crônica não evolutiva, ausência de linguagem, hipotonia e sinais de autismo, que estão presentes no paciente desse trio.

O gene *GABBR2* codifica receptores GABA tipo B; esses receptores metabotrópicos transmembrana estimulam a abertura de canais de potássio, levando à hiperpolarização do neurônio, evitando assim a abertura dos canais de sódio e o

disparo do potencial de ação; ele também impede a abertura dos canais de cálcio dependente de voltagem, resultando no impedimento da liberação de neurotransmissores; desta forma os receptores GABA<sub>B</sub> são classificados como receptores inibidores. A maior expressão desse gene ocorre no cérebro, principalmente no córtex frontal. (KERR; ONG, 1995; KAUPMANN et al., 1998).

No banco de dados OMIM encontramos apenas associação de polimorfismos no gene *GABBR2* com susceptibilidade à dependência de nicotina (OMIM \*607340). De acordo com o banco de dados MGI, que contém informação integrada de genética, genômica e dados biológicos em camundongos (informatics.jax.org), mutações no gene Gabbr2 foram associadas a fenótipos relacionados a comportamento e funcionamento do sistema nervoso; as alterações em homozigose nesse gene, em camundongos, resultam em convulsões clônicas, hiperatividade e hiperalgesia.

Em 2014, um estudo com a colaboração de dois consórcios (EuroEPINOMIC e Epi4k/EPGP) relatou os resultados do sequenciamento de exoma de 356 trios (pacientes e genitores) de portadores de encefalopatia epilética, espasmo infantil ou síndrome de Lennox-Gastaut, que engloba vários tipos de epilepsia. Foram detectadas 429 mutações de novo em diversos genes que podiam levar à desregulação sináptica, incluindo dois indivíduos com mutações missense preditas como possivelmente danosas em *GABBR2*. Esses pacientes apresentavam hipotonia, ataxia, deficiência intelectual grave, ausência de fala e sinais de autismo; um deles apresentava convulsões e o outro só apresentou crises convulsivas até os 5 meses de idade (EUROEPINOMICS-RES CONSORTIUM, 2014).

O estudo mais recente envolvendo mutações no *GABBR2*, foi publicado esse ano por Lopes e colaboradores; o estudo teve como objetivo identificar novas causas genéticas em pacientes *Rett-like*. A síndrome de Rett é uma doença grave que afeta o desenvolvimento neurológico; a síndrome clássica é ligada ao X e afeta mais meninas, normalmente letal em meninos; os pacientes possuem um desenvolvimento pré e perinatal aparentemente normal seguido por uma estagnação no desenvolvimento, além de severa regressão no desenvolvimento da linguagem e habilidade motora; pacientes com essa síndrome ou com sintomas semelhantes a esse fenótipo, apresentam frequentemente deficiência intelectual, características autistas e epilepsia. Nesse estudo, 19 pacientes *Rett-like* (16 meninas e 3 meninos)

que não apresentavam alterações nos três genes já associados com síndrome (*MECP2*, *CDKL5* e *FOXG1*), foram submetidos ao sequenciamento de exoma. Dentre as alterações identificadas, foi detectada uma mutação *missense*, de novo, no gene *GABBR2*. O indivíduo com mutação em *GABBR2* apresentou estagnação do desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de quadros convulsivos, e sintomas semelhantes àqueles relatados no estudo de 2014, descrito no parágrafo anterior (deficiência intelectual grave, ausência de linguagem, e características autistas) (LOPES et al., 2016).

Apesar da associação do gene *GABBR2* com a deficiência intelectual ainda não estar bem estabelecida, este gene é um ótimo candidato devido à sua atuação no sistema nervoso central, e as mutações detectadas nesse gene em pacientes com DI e em camundongos com convulsões reforçam sua causalidade. A mutação de novo missense identificada no gene *GABBR2* em nosso paciente foi predita danosa pelo SIFT, e seu impacto considerado moderado (VEP). Assim, dada a semelhança de sintomas que o paciente compartilha com indivíduos (e camundongos) que possuem mutações em *GABBR2*, associada à predição, impacto da variante e à função do gene no sistema nervoso, consideramos a alteração como causa molecular muito provável do fenótipo do paciente. A detecção de uma alteração nesse gene em um paciente com DI e encefalopatia crônica não progressiva no presente trabalho, substancia a hipótese de que *GABBR2* é um gene associado a deficiência intelectual.

# VI.1.4 PCGH1454

Na Paciente desse trio, 6 anos, foi detectada uma mutação de novo, em heterozigose, no gene *CDK13*. Essa variante foi considerada candidata a justificar o fenótipo em questão, uma vez que mutações nesse gene já foram associadas a quadros de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual, dismorfias faciais, e alterações cardíacas, características que estão presentes na paciente.

O gene *CDK13* codifica uma proteína que é um membro da família de proteínas ciclinas dependentes de quinases; membros dessa família são conhecidos pelo papel que exercem no controle do ciclo celular. *CDK13* é expresso de forma específica em alguns tecidos, sendo eles, o cérebro fetal, fígado, músculo e no cérebro adulto

(BLAZEK et al., 2011); embora a expressão específica desse gene no coração não tenha sido reportada até agora, mutações já foram detectadas em coorte de pacientes com alteração cardíaca congênita (SIFRIM et al., 2016).

Em 2014, Chen e colaboradores realizaram um estudo, cujo objetivo foi investigar as possíveis funções de *CDK12* e *CDK13* durante o desenvolvimento neuronal; esses dois genes foram escolhidos devido à expressão abundante no sistema nervoso. Utilizando células de carcinoma embrionário de camundongo, que se diferencia em neurônios, e cultura primária de neurônios corticais de camundongo, eles demonstraram que a expressão reduzida e modelos *knockdown* dos genes *CDK12* e *CDK13* resultam na formação de neurônios com axônios curtos. Nesse estudo, ainda foi demonstrado que *CDK12* e *CDK13* promovem o alongamento de axônios através de uma via de sinalização celular que envolve *CDK5*, o qual é importante na dinâmica dos microtúbulos nos neurônios. Os autores demonstraram também que as proteínas cdk12 e cdk13 eram expressas no cérebro de camundongos em todos os estágios embrionários. Estes resultados dão suporte à ideia de que o *CDK12* e *CDK13* são essenciais para a extensão axonal e que desempenham papel no desenvolvimento do sistema nervoso (CHEN et al., 2014).

Recentemente, Sifrim e colaboradores, detectaram 7 mutações no gene *CDK13* (6 de novo e uma com herança não esclarecida) entre 610 pacientes com doença cardíaca sindrômica; quatro das mutações eram idênticas (p.Asn842Ser) e todas as mutações afetavam o domínio quinase serina/treonina altamente conservado; embora a variante identificada em nossa paciente não tenha sido descrita, ela afeta o mesmo domínio quinase serina/treonina alterado nos outros pacientes. Todos os pacientes com mutação nesse gene apresentavam, além de defeitos no septo cardíaco, atraso no desenvolvimento e dimorfismos faciais (incluindo microcefalia de leve a moderada); alguns pacientes ainda possuíam outros sintomas como anormalidades na válvula pulmonar, deficiência intelectual, hipotonia, agenesia do corpo caloso, dentre outros; estudo dessas mutações mostraram que elas interferem com a ligação ao ATP e na interação com a ciclina (SIFRIM et al., 2016).

Apesar de mutações no gene *CDK13* terem sido averiguadas em coortes de pacientes com problemas cardíacos (defeitos no septo), todos os pacientes com mutação nesse gene apresentavam também atraso do desenvolvimento, e dismorfias faciais

(incluindo a microcefalia); a deficiência intelectual estava presente em aproximadamente 85,7% dos pacientes com alteração. A surpresa em nossa paciente com mutação em *CDK13* é a ausência de microcefalia (de leve a moderada), pois seu perímetro cefálico encontra-se no percentil 50, demonstrando que mutações nesse gene podem resultar em fenótipos relacionados principalmente com o atraso do desenvolvimento e problemas cardíacos, e indicando uma possível exclusão da microcefalia como sinal obrigatório.

Todas as mutações em *CDK13* descritas até o momento, incluindo a da paciente aqui em questão, são missense, de novo e em heterozigose, compatível com padrão de herança dominante. As predições de patogenicidade, danoso e provavelmente danoso (SIFT e PolyPhen), a ausência nos bancos de dados dbSNP e ExAC da variante detectada em nossa paciente (**Tabela 9**), a localização da variante no mesmo domínio previamente descrito para outros pacientes, e a presença de DI associada a defeito de septo cardíaco deixam pouca dúvida quanto à causalidade dessa variante para o quadro clínico da paciente. Já foi previamente relatado, embora em um único estudo, que *CDK13* é um gene com impacto significativo em coortes de pacientes com anomalias cardíacas sindrômicas. O impacto desse gene em coortes de DI ainda precisa ser determinado.

# VI.1.5 PCGH1005

Na Paciente desse trio, 23 anos, foi detectada através da análise do exoma uma alteração de novo, em heterozigose, no gene *DDX3X*, que foi considerada candidata a justificar o fenótipo em questão, uma vez que mutações nesse gene já foram associadas como causa molecular (principalmente em mulheres) de DI, atraso do desenvolvimento, dismorfias faciais, e deficiência auditiva bilateral, sinais que estão presentes na paciente.

Esse gene codifica uma proteína do grupo DEAD box, que atuam em processos metabólicos geralmente envolvendo RNA ou outros ácidos nucléicos; o gene *DDX3X* codifica uma RNA helicase, a qual é importante em vários processos celulares, dentre eles a transcrição, tradução, *splicing*, e transporte de RNA (SHARMA; JANKOWSKY, 2014). Esse gene já havia sido proposto como novo candidato para DI (RAUCH et al.,

2012) e, recentemente, um estudo demonstrou que a depleção do gene *DDX3X* em neurônios, altera o crescimento das projeções neuronais (axônios e dendritos), sugerindo a atuação desse gene na formação do citoesqueleto dessas células (CHEN et al., 2016).

Uma publicação recente (SNIJDERS BLOK et al., 2015) descreveu o sequenciamento de exoma (WES) em um total de 6.072 indivíduos (3.413 homens e 2.659 mulheres) com deficiência intelectual esporádica, e identificou mutações de novo no gene DDX3X em 38 mulheres; foram identificadas 35 mutações diferentes, 19 Loss of Function (LoF), 15 missense e uma deleção. As pacientes com mutação no DDX3X apresentavam diferentes graus de DI ou atraso do desenvolvimento, além de outros sinais variáveis, incluindo: hipotonia (76%); distúrbio de movimento, espasticidade, pernas rígidas ou passadas largas (45%); microcefalia (32%); alterações comportamentais como desordens do espectro autista, hiperatividade e agressão (53%); e epilepsia (16%). Outras características não neuronais que também estavam presentes eram hipermobilidade articular, anormalidade na pigmentação da pele, fenda labial e/ou palatina, deficiência auditiva e visual, e puberdade precoce. O gene DDX3X escapa da inativação do cromossomo X; de acordo com o autor, alterações dominantes no X que escapam da inativação geralmente estão associadas a transcritos que possuem uma expressão inconstante e levam a um quadro fenotípico variável em mulheres. Experimentos realizados com zebrafish no mesmo estudo, mostraram que a ausência desse gene resulta em tamanho reduzido do cérebro. Com padrão de herança dominante, os autores estimam que mutações nesse gene devem ser responsáveis por 1-3% da DI idiopática em mulheres. Poucas famílias em que mutações no gene DDX3X segregam com DI em homens também foram detectadas; essas mutações são herdadas de mulheres portadoras não afetadas, indicando um padrão de herança recessivo ligado ao X.

O quadro clínico da Paciente PCGH1005 é compatível com fenótipo descrito em mulheres portadoras de alteração no *DDX3X*, explicando DI, deficiência auditiva bilateral, dimorfismos faciais e anomalias aparentes em ressonância magnética de cérebro. Outros sinais da Paciente como doença renal multicística e apêndices préauriculares não foram descritos em outros pacientes, porém como o número de mutações descritas ainda é relativamente pequeno e o quadro clínico muito heterogêneo, a presença desses sinais não parece ser incompatível com a mutação. A troca T/C (X:41206163) detectada na nossa paciente é: de novo, como todos os casos de mulheres afetadas com mutações em *DDX3X*; missense, como a maioria das mutações descritas; predita danosa e provavelmente danosa, como as mutações reportadas que tem predições. A troca de nucleotídeo acarreta a troca de um aminoácido leucina por serina na posição 556 e é uma variante ainda não descrita. Dessa forma, a semelhança de sintomas que a paciente compartilha com mulheres que possuem mutações em *DDX3X* e a raridade e predição de patogenicidade da variante, nos levaram a considerar a variante detectada como causa molecular do fenótipo da paciente.

#### VI.1.6 PCGH1031

Na paciente desse trio, 5 anos, a análise do exoma detectou alterações potencialmente causativas do fenótipo, em heterozigose composta, nos genes *VPS13B* e *NALCN*; alterações recessivas em um, outro ou ambos os genes já foram associadas como causa molecular de sinais clínicos como atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, alterações visuais, microcefalia, dismorfias faciais, ausência de linguagem, orelhas grandes com implantação baixa e hipotonia, sinais que estão presentes na paciente desse trio.

O gene *VPS13B* codifica uma proteína transmembrana que funciona mediando o transporte de vesículas na célula e triando proteínas intracelulares; essa proteína possivelmente também atua no desenvolvimento e funcionamento dos olhos, do sistema hematopoiético e do sistema nervoso central. Mutações nesse gene foram associadas à síndrome de Cohen (OMIM\*216550), caracterizada por baixa estatura, microcefalia, hipoplasia de maxilar, micrognatia, hipotonia facial, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, alterações oculares (miopia, distrofia coriorretiniana, redução da acuidade visual, e atrofia óptica), alterações esqueléticas, pregas transversais palmares, DI, dentre outros. Essa síndrome rara possui herança recessiva, com maior número de afetados na população finlandesa, que apresentam um fenótipo homogêneo, possivelmente devido à alta frequência de uma mesma mutação; estudos dessa síndrome em outras populações, relatam uma maior variabilidade no fenótipo (HENNIES et al., 2004; DUPLOMB et al., 2014).

Desde a descrição dessa síndrome por Cohen e colaboradores (COHEN et al., 1973), vários estudos foram realizados e detectaram várias alterações recessivas nos afetados, em homozigose ou heterozigose composta, no gene *VPS13B*; as mutações detectadas foram classificadas como *nonsense*, *frameshift*, *missense*, deleções e em sítios de *splicing*, porém a maioria dessas alterações levavam à formação de um códon de parada (HENNIES et al., 2004; SEIFERT et al., 2006).

A variabilidade fenotípica apresentada por pacientes com síndrome de Cohen também foi reportada por diversas pesquisas ao longo dos anos; Heinnes e colaboradores, que estudaram 20 pacientes de países distintos com esse quadro clínico, verificaram que as características clínicas compartilhadas por todos eles eram atraso no desenvolvimento, DI não progressiva, anormalidades visuais (miopia era a mais frequente), frouxidão ligamentar e dismorfias faciais (HENNIES et al., 2004). Em 2010 El Chehadeh e colaboradores estudaram pacientes com suspeita de síndrome de Cohen, com o objetivo de detectar quais sintomas eram os melhores indicadores da presença de mutação no gene VPS13B; a característica clínica que estavam presente em todos os portadores de mutação nesse gene era a microcefalia, seguida de neutropenia ou distrofia coriorretiniana (92% dos pacientes); portanto, todos os pacientes com mutação nesse gene apresentavam obrigatoriamente, além da microcefalia, distrofia coriorretiniana e/ou neutropenia (EL CHEHADEH et al., 2010). Reforçando a presença de microcefalia, neutropenia e retinopatias como sintomas obrigatórios de pacientes com mutação em VPS13B, Geuneau e colaboradores reportaram uma paciente com mutação em sítios de splicing nesse gene, que apresentava esses três sinais clínicos e dismorfias faciais, sem deficiência intelectual (GUENEAU et al., 2014).

As variantes identificadas no gene *VPS13B* na nossa paciente foram classificadas como *loss of function*; ambas foram preditas danosas e seu impacto classificado como alto pelo VEP. A troca C/T (8:100654570) está presente no dbSNP e no banco de dados do ClinVar onde ela foi classificada como provavelmente patogênica; a troca C/G (8:100865871) não foi encontrada em nenhum dos bancos de dados consultados (**Tabela 9**); as duas trocas de nucleotídeo resultam na formação de códons de parada, TGA e TAG, respectivamente.

A segunda alteração em heterozigose composta detectada na paciente foi no gene *NALCN*, o qual codifica um canal de cátion, independente de voltagem, não seletivo, e permeável ao sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>), responsável pela condução de sódio nos neurônios, controlando assim a excitabilidade dessas células. A maior expressão desse gene ocorre no cérebro (LU et al., 2007).

Mutações autossômicas recessivas nesse gene foram relacionadas com guadro clínico de hipotonia infantil com retardo psicomotor e características faciais (Hypotonia, infantile, with psychomotor retardation and characteristic facies 1, IHPRF1, OMIM\*6154). Pacientes com mutações bialélicas nesse gene podem apresentar retardo no crescimento pós-natal, microcefalia, braquicefalia, face triangular, micrognatia, atraso psicomotor, ausência ou pouco desenvolvimento da fala, dismorfias faciais (baixa implantação das orelhas, estrabismo, micrognatia, testa proeminente, boca larga, nariz pequeno), atrofia muscular, escoliose, dentre outros. Seven e colaboradores (SEVEN et al., 2002) foram os primeiros que descreveram esse quadro clínico em dois pacientes (irmãos) nascidos do casamento de primos de primeiro grau. Os sintomas principais apresentados por eles eram hipotonia, microcefalia, ausência de linguagem e de contato visual; outros casos com fenótipo variável foram posteriormente relatados, porém sinais como microcefalia. ausência/atraso do desenvolvimento da linguagem e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor estavam sempre presentes (KOROGLU et al., 2013; AL-SAYED et al., 2013). Mais recentemente, Fukai e colaboradores identificaram 14 mutações de novo no gene NALCN através do sequenciamento de exoma de 15 pacientes com artogripose distal (contratura congênita dos membros), ataxia, hipotonia, deficiência intelectual, microcefalia e alterações faciais (FUKAI et al., 2016).

A mutação em heterozigose composta detectada em nosso sequenciamento no gene *NALCN* foram descritas como danosa e possivelmente danosa pelos algoritmos utilizados no trabalho; as trocas *missense* C/T (13:101717778) e C/A (13:101721179) encontram-se presente no ExAC e dbSNP, com frequência muito menor que 1% (**Tabela 9**); o impacto da alteração foi classificado como moderado pelo VEP.

Tendo em vista a presença de variantes potencialmente patogênicas tanto em *VPS13B* quanto em *NALCN*, a Paciente foi reconvocada e compareceu ao CEGH-USP para uma nova avaliação médica feita pelo Dr<sup>o</sup> Paulo Otto, especificamente para avaliar a compatibilidade de seu fenótipo com as síndromes candidatas. Após a avaliação, foi concluído que a paciente não possui características semelhantes a portadores da síndrome de Cohen; apesar de ela apresentar alguns sinais compatíveis com o quadro, características obrigatórias, segundo estudos relatados anteriormente, como neutropenia, distrofia coriorretiniana e face característica não estão presentes. Vários sinais clínicos da paciente foram compatíveis com aqueles apresentados por indivíduos com mutação recessiva no *NALCN*, dentre eles, microcefalia, hipotonia, orelhas grandes com baixa implantação, dismorfias faciais e, principalmente, ausência do desenvolvimento da linguagem, que é uma característica marcante nos portadores de mutações recessivas nesse gene. Assim, a semelhança de sintomas que a paciente compartilha com indivíduos que possuem mutações no *NALCN*, associado com a predição da troca de nucleotídeos e o impacto da variante, contribuíram para que considerássemos essa variante como a causa molecular responsável pelo fenótipo da paciente.

A questão que permanece é como um paciente pode apresentar variantes em *VPS13B* com perda de função, preditas patogênicas, e não manifestar quadro clínico compatível com síndrome de Cohen. A explicação mais simples seria considerar, como é parte do modelo de suposta heterozigose composta, que as variantes mapeiam no mesmo homólogo. Porém, os resultados do sequenciamento de exoma mostra que cada variante foi herdada de um dos genitores, descartando essa hipótese. O sequenciamento de exomas/genomas em larga escada tende a aumentar a lista de variantes que aparentemente não produzem quadro clínico.

Capítulo VII: Conclusões

# VII.1. Qualidade necessária para o uso das metodologias WES e sequenciamento Sanger para diagnóstico

A partir desse projeto, também foi possível derivar conclusões sobre a qualidade do nosso sequenciamento de nova geração, que começou a ser utilizado no para a interface pesquisa/diagnóstico em laboratório no ano de 2014. Nossos dados sugerem que, quando observamos no sequenciamento de exoma alterações com boa qualidade de mapeamento (>5) e cobertura ≥10 *reads,* as variantes estão realmente presentes nos indivíduos portadores; estes achados, se confirmados em um número maior de amostras, indicariam que a confirmação por sequenciamento Sanger é desnecessária.

# VII.2. Taxa de diagnóstico

Esse trabalho, através do WES de trios (pai, mãe e paciente), levou ao diagnóstico provável da causa molecular da deficiência intelectual em 5 pacientes dos 8 casos esporádicos de DI investigados (PCGH948, PCGH584, PCGH1454, PCGH1005, PCGH1031); embora esse número de amostras seja pequeno, a taxa de diagnóstico foi de 62,5%, muito acima dos 15-30% relatados na literatura quando essa metodologia é utilizada.

Três probando, PCGH319, PCGH289 e PCGH856 não foram diagnosticados através dessa metodologia, que prioriza o sequenciamento dos exons; esses pacientes que não obtiveram um diagnóstico podem ter a causa molecular dos seus fenótipos elucidada através do sequenciamento do genoma completo, associada ou não ao sequenciamento do RNAm, que permite detectar alterações e regiões não exônicas. A realização do perfil de metilação e o uso de novas *pipelines* que considerem variantes em genes imprintados durante a análise, também podem levar à elucidação da causa molecular desses fenótipos (BODIAN et al., 2014; ATEN et al., 2016; FERREIRA et al., 2016; YUEN et al., 2016).

É importante notar, porém, que o sequenciamento do exoma está longe de propiciar cobertura alta em todas as regiões alvo. Nesses três pacientes, cobertura > 10 reads foi obtida em aproximadamente 58,7% das sequências, indicando que aproximadamente 41,3% não possuía cobertura adequada e, portanto, poderiam

conter alterações que não seriam detectadas. Do ponto de vista de diagnóstico, sobretudo nos casos em que a causa não pode ser determinada, seria relevante também listar os genes que não foram examinados satisfatoriamente.

#### VII.3. Mutações novas

Após a análise dos dados e confirmação por Sequenciamento Sanger, foram detectadas 5 alterações ainda não descritas nos bancos de dados consultados (ExAC e 1000 *genomes*), quatro delas em genes já associados (mesmo que primariamente) com quadros de deficiência intelectual (*DDX3X*, *VPS13B*, *GABBR2*, *CDK13*), e uma detectada no gene *RYR2*, associado a alterações cardíacas. Todas essas novas mutações foram preditas danosas por pelo menos um dos algoritmos utilizados nesse trabalho (SIFT e PolyPhen), com o impacto variando de moderado a alto de acordo com a análise do VEP (ensembl.org/Tools/VEP). Quatro delas foram consideradas prováveis causas dos fenótipos, enquanto as mutações de perda de função em *VPS13B* foram consideradas não causativas, mostrando que a avaliação de variantes não caracterizadas é complexa e os critérios nem sempre evidentes.

# VII.4. Evidências que confirmam o papel na DI de genes ainda pouco caracterizados

Nesse projeto, apesar de não termos detectados genes novos associados com a deficiência intelectual, encontramos alterações de novo em dois genes que até hoje não têm seu papel na DI totalmente esclarecido e que ainda não são considerados genes OMIM para doenças congênitas. O *GABBR2*, já teve sua ação nos neurônios elucidada e mutações nesse gene já foram detectadas em raros pacientes com deficiência intelectual e quadros convulsivos, relatados em dois estudos (EuroEPINOMICS-RES CONSORTIUM, 2014; LOPES et al., 2016). O gene *CDK13*, também já teve seu papel no desenvolvimento dos neurônios relatado, e alterações nesse gene só foram descritas por um único estudo investigando uma coorte de pacientes que apresentavam alterações cardíacas congênitas; os pacientes com mutações em CDK13 apresentavam, além de alterações cardíacas, DI, alterações faciais e microcefalia (SIFRIM et al., 2016). Portanto, nosso trabalho contribuiu para

caracterizar esses genes como responsáveis por quadros de DI, associada ou não a outros sintomas.

Referências

AFAWI, Z.; MANDELSTAM, S.; KORCZYN, A. D.; KIVITY, S.; WALID, S.; SHALATA, A.; OLIVER, K. L.; CORBETT, M.; GECZ, J.; BERKOVIC, S. F.; JACKSON, G. D. TBC1D24 Mutation Associated with Focal Epilepsy, Cognitive Impairment and a Distinctive Cerebro-Cerebellar Malformation. **Epilepsy Research**, v. 105, n. 1–2, p. 240–244, jul. 2013.

AGHA, Z.; IQBAL, Z.; AZAM, M.; AYUB, H.; VISSERS, L. E. L. M.; GILISSEN, C.; ALI, S. H. B.; RIAZ, M.; VELTMAN, J. A.; PFUNDT, R.; VAN BOKHOVEN, H.; QAMAR, R. Exome Sequencing Identifies Three Novel Candidate Genes Implicated in Intellectual Disability. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112687, 18 nov. 2014.

AHMED, I.; BUCHERT, R.; ZHOU, M.; JIAO, X.; MITTAL, K.; SHEIKH, T. I.; SCHELLER, U.; VASLI, N.; RAFIQ, M. A.; BROHI, M. Q.; MIKHAILOV, A.; AYAZ, M.; BHATTI, A.; STICHT, H.; NASR, T.; CARTER, M. T.; UEBE, S.; REIS, A.; AYUB, M.; JOHN, P.; KILEDJIAN, M.; VINCENT, J. B.; JAMRA, R. A. Mutations in DCPS and EDC3 in Autosomal Recessive Intellectual Disability Indicate a Crucial Role for mRNA Decapping in Neurodevelopment. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 11, p. 3172–3180, 1 jun. 2015.

ALLALI, S.; LE GOFF, C.; PRESSAC-DIEBOLD, I.; PFENNIG, G.; MAHAUT, C.; DAGONEAU, N.; ALANAY, Y.; BRADY, A. F.; CROW, Y. J.; DEVRIENDT, K.; DROUIN-GARRAUD, V.; FLORI, E.; GENEVIEVE, D.; HENNEKAM, R. C.; HURST, J.; KRAKOW, D.; LE MERRER, M.; LICHTENBELT, K. D.; LYNCH, S. A.; LYONNET, S.; MACDERMOT, K.; MANSOUR, S.; MEGARBANE, A.; SANTOS, H. G.; SPLITT, M.; SUPERTI-FURGA, A.; UNGER, S.; WILLIAMS, D.; MUNNICH, A.; CORMIER-DAIRE, V. Molecular Screening of ADAMTSL2 Gene in 33 Patients Reveals the Genetic Heterogeneity of Geleophysic Dysplasia. Journal of Medical Genetics, v. 48, n. 6, p. 417–421, 1 jun. 2011.

AL-SAYED, M. D.; AL-ZAIDAN, H.; ALBAKHEET, A.; HAKAMI, H.; KENANA, R.; AL-YAFEE, Y.; AL-DOSARY, M.; QARI, A.; AL-SHEDDI, T.; AL-MUHEIZA, M.; AL-QUBBAJ, W.; LAKMACHE, Y.; AL-HINDI, H.; GHAZIUDDIN, M.; COLAK, D.; KAYA, N. Mutations in NALCN Cause an Autosomal-Recessive Syndrome with Severe Hypotonia, Speech Impairment, and Cognitive Delay. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 4, p. 721–726, out. 2013.

AMIR, R. E.; VAN DEN VEYVER, I. B.; WAN, M.; TRAN, C. Q.; FRANCKE, U.; ZOGHBI, H. Y. Rett Syndrome Is Caused by Mutations in X-Linked MECP2, Encoding Methyl-CpG-Binding Protein 2. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 185–188, out. 1999.

APARICIO, S. A. J. R.; HUNTSMAN, D. G. Does Massively Parallel DNA Resequencing Signify the End of Histopathology as We Know It? **The Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 307–315, jan. 2010.

ARNOLD, J. Beobachtungen über Kerntheilungen in den Zellen der Geschwülste. Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin, v. 78, n. 2, p. 279–301, nov. 1879.

ASHTON, P. M.; NAIR, S.; DALLMAN, T.; RUBINO, S.; RABSCH, W.; MWAIGWISYA, S.; WAIN, J.; O'GRADY, J. MinION Nanopore Sequencing Identifies the Position and Structure of a Bacterial Antibiotic Resistance Island. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 296–300, mar. 2015. ATEN, E.; FOUNTAIN, M. D.; VAN HAERINGEN, A.; SCHAAF, C. P.; SANTEN, G. W. E. Imprinting: the Achilles heel of trio-based exome sequencing. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 1163–1164, nov. 2016.

BALESTRINI, S.; MILH, M.; CASTIGLIONI, C.; LÜTHY, K.; FINELLI, M. J.; VERSTREKEN, P.; CARDON, A.; STRAŽIŠAR, B. G.; HOLDER, J. L.; LESCA, G.; MANCARDI, M. M.; POULAT, A. L.; REPETTO, G. M.; BANKA, S.; BILO, L.; BIRKELAND, L. E.; BOSCH, F.; BROCKMANN, K.; CROSS, J. H.; DOUMMAR, D.; FÉLIX, T. M.; GIULIANO, F.; HORI, M.; HÜNING, I.; KAYSERILI, H.; KINI, U.; LEES, M. M.; MEENAKSHI, G.; MEWASINGH, L.; PAGNAMENTA, A. T.; PELUSO, S.; MEY, A.; RICE, G. M.; ROSENFELD, J. A.; TAYLOR, J. C.; TROESTER, M. M.; STANLEY, C. M.; VILLE, D.; WALKIEWICZ, M.; FALACE, A.; FASSIO, A.; LEMKE, J. R.; BISKUP, S.; TARDIF, J.; AJEAWUNG, N. F.; TOLUN, A.; CORBETT, M.; GECZ, J.; AFAWI, Z.; HOWELL, K. B.; OLIVER, K. L.; BERKOVIC, S. F.; SCHEFFER, I. E.; DE FALCO, F. A.; OLIVER, P. L.; STRIANO, P.; ZARA, F.; CAMPEAU, P. M.; SISODIYA, S. M. *TBC1D24* Genotype–phenotype Correlation: Epilepsies and Other Neurologic Features. **Neurology**, v. 87, n. 1, p. 77–85, 5 jul. 2016.

BAMSHAD, M. J.; NG, S. B.; BIGHAM, A. W.; TABOR, H. K.; EMOND, M. J.; NICKERSON, D. A.; SHENDURE, J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 11, p. 745–755, 27 set. 2011.

BASEL-VANAGAITE, L.; ATTIA, R.; YAHAV, M.; FERLAND, R. J.; ANTEKI, L.; WALSH, C. A.; OLENDER, T.; STRAUSSBERG, R.; MAGAL, N.; TAUB, E.; DRASINOVER, V.; ALKELAI, A.; BERCOVICH, D.; RECHAVI, G.; SIMON, A. J.; SHOHAT, M. The CC2D1A, a Member of a New Gene Family with C2 Domains, Is Involved in Autosomal Recessive Non-Syndromic Mental Retardation. Journal of Medical Genetics, v. 43, n. 3, p. 203–210, mar. 2006.

BENKUSKY, N. A.; FARRELL, E. F.; VALDIVIA, H. H. Ryanodine Receptor Channelopathies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 4, p. 1280–1285, 1 out. 2004.

BEN-SHACHAR, S.; OU, Z.; SHAW, C. A.; BELMONT, J. W.; PATEL, M. S.; HUMMEL, M.; AMATO, S.; TARTAGLIA, N.; BERG, J.; SUTTON, V. R.; LALANI, S. R.; CHINAULT, A. C.; CHEUNG, S. W.; LUPSKI, J. R.; PATEL, A. 22q11.2 Distal Deletion: A Recurrent Genomic Disorder Distinct from DiGeorge Syndrome and Velocardiofacial Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 1, p. 214–221, jan. 2008.

BENTLEY, D. R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOW, H. P.; SMITH, G. P.; MILTON, J.; BROWN, C. G.; HALL, K. P.; EVERS, D. J.; BARNES, C. L.; BIGNELL, H. R.; BOUTELL, J. M.; BRYANT, J.; CARTER, R. J.; KEIRA CHEETHAM, R.; COX, A. J.; ELLIS, D. J.; FLATBUSH, M. R.; GORMLEY, N. A.; HUMPHRAY, S. J.; IRVING, L. J.; KARBELASHVILI, M. S.; KIRK, S. M.; LI, H.; LIU, X.; MAISINGER, K. S.; MURRAY, L. J.; OBRADOVIC, B.; OST, T.; PARKINSON, M. L.; PRATT, M. R.; RASOLONJATOVO, I. M. J.; REED, M. T.; RIGATTI, R.; RODIGHIERO, C.; ROSS, M. T.; SABOT, A.; SANKAR, S. V.; SCALLY, A.; SCHROTH, G. P.; SMITH, M. E.; SMITH, V. P.; SPIRIDOU, A.; TORRANCE, P. E.; TZONEV, S. S.; VERMAAS, E. H.; WALTER, K.; WU, X.; ZHANG, L.; ALAM, M. D.; ANASTASI, C.; ANIEBO, I. C.; BAILEY, D. M. D.; BANCARZ, I. R.; BANERJEE, S.; BARBOUR, S. G.; BAYBAYAN, P. A.; BENOIT, V. A.; BENSON, K. F.; BEVIS, C.; BLACK, P. J.; BOODHUN, A.; BRENNAN, J. S.; BRIDGHAM, J. A.; BROWN, R. C.; BROWN, A. A.; BUERMANN, D. H.; BUNDU, A. A.; BURROWS, J. C.; CARTER, N. P.; CASTILLO, N.; CHIARA E. CATENAZZI, M.; CHANG, S.; NEIL COOLEY, R.; CRAKE, N. R.; DADA, O. O.; DIAKOUMAKOS, K. D.; DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B.; EARNSHAW, D. J.; EGBUJOR, U. C.; ELMORE, D. W.; ETCHIN, S. S.; EWAN, M. R.; FEDURCO, M.; FRASER, L. J.; FUENTES FAJARDO, K. V.; SCOTT FUREY, W.; GEORGE, D.; GIETZEN, K. J.; GODDARD, C. P.; GOLDA, G. S.; GRANIERI, P. A.; GREEN, D. E.; GUSTAFSON, D. L.; HANSEN, N. F.; HARNISH, K.; HAUDENSCHILD, C. D.; HEYER, N. I.; HIMS, M. M.; HO, J. T.; HORGAN, A. M.; HOSCHLER, K.; HURWITZ, S.; IVANOV, D. V.; JOHNSON, M. Q.; JAMES. T.: HUW JONES. T. A.: KANG. G.-D.: KERELSKA. T. H.: KERSEY. A. D.: KHREBTUKOVA, I.; KINDWALL, A. P.; KINGSBURY, Z.; KOKKO-GONZALES, P. I.; KUMAR, A.; LAURENT, M. A.; LAWLEY, C. T.; LEE, S. E.; LEE, X.; LIAO, A. K.; LOCH, J. A.; LOK, M.; LUO, S.; MAMMEN, R. M.; MARTIN, J. W.; MCCAULEY, P. G.; MCNITT, P.; MEHTA, P.; MOON, K. W.; MULLENS, J. W.; NEWINGTON, T.; NING, Z.; LING NG, B.; NOVO, S. M.; O'NEILL, M. J.; OSBORNE, M. A.; OSNOWSKI, A.; OSTADAN, O.; PARASCHOS, L. L.; PICKERING, L.; PIKE, A. C.; PIKE, A. C.; CHRIS PINKARD, D.; PLISKIN, D. P.; PODHASKY, J.; QUIJANO, V. J.; RACZY, C.; RAE, V. H.; RAWLINGS, S. R.; CHIVA RODRIGUEZ, A.; ROE, P. M.; ROGERS, J.; ROGERT BACIGALUPO, M. C.; ROMANOV, N.; ROMIEU, A.; ROTH, R. K.; ROURKE, N. J.; RUEDIGER, S. T.; RUSMAN, E.; SANCHES-KUIPER, R. M.; SCHENKER, M. R.; SEOANE, J. M.; SHAW, R. J.; SHIVER, M. K.; SHORT, S. W.; SIZTO, N. L.; SLUIS, J. P.; SMITH, M. A.; ERNEST SOHNA SOHNA, J.; SPENCE, E. J.; STEVENS, K.; N.; SZAJKOWSKI, TREGIDGO, C. L.; SUTTON. L.; TURCATTI, G.: VANDEVONDELE, S.; VERHOVSKY, Y.; VIRK, S. M.; WAKELIN, S.; WALCOTT, G. C.; WANG, J.; WORSLEY, G. J.; YAN, J.; YAU, L.; ZUERLEIN, M.; ROGERS, J.; MULLIKIN, J. C.; HURLES, M. E.; MCCOOKE, N. J.; WEST, J. S.; OAKS, F. L.; LUNDBERG, P. L.; KLENERMAN, D.; DURBIN, R.; SMITH, A. J. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature, v. 456, n. 7218, p. 53–59, 6 nov. 2008.

BERGMANN, C. Oligophrenin 1 (OPHN1) Gene Mutation Causes Syndromic X-Linked Mental Retardation with Epilepsy, Rostral Ventricular Enlargement and Cerebellar Hypoplasia. **Brain**, v. 126, n. 7, p. 1537–1544, 22 abr. 2003.

BERKEL, S.; MARSHALL, C. R.; WEISS, B.; HOWE, J.; ROETH, R.; MOOG, U.; ENDRIS, V.; ROBERTS, W.; SZATMARI, P.; PINTO, D.; BONIN, M.; RIESS, A.; ENGELS, H.; SPRENGEL, R.; SCHERER, S. W.; RAPPOLD, G. A. Mutations in the SHANK2 Synaptic Scaffolding Gene in Autism Spectrum Disorder and Mental Retardation. **Nature Genetics**, v. 42, n. 6, p. 489–491, jun. 2010.

BHALLA, K.; LUO, Y.; BUCHAN, T.; BEACHEM, M. A.; GUZAUSKAS, G. F.; LADD, S.; BRATCHER, S. J.; SCHROER, R. J.; BALSAMO, J.; DUPONT, B. R.; LILIEN, J.; SRIVASTAVA, A. K. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in Patients with Mild to Severe Intellectual Disability. **The American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 6, p. 703–713, dez. 2008.

BILLUART, P.; BIENVENU, T.; RONCE, N.; DES PORTES, V.; VINET, M. C.; ZEMNI, R.; ROEST CROLLIUS, H.; CARRIÉ, A.; FAUCHEREAU, F.; CHERRY, M.; BRIAULT, S.; HAMEL, B.; FRYNS, J. P.; BELDJORD, C.; KAHN, A.; MORAINE, C.; CHELLY, J. Oligophrenin-1 Encodes a rhoGAP Protein Involved in X-Linked Mental Retardation. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 923–926, 30 abr. 1998.

BISSAR-TADMOURI, N.; DONAHUE, W. L.; AL-GAZALI, L.; NELSON, S. F.; BAYRAK-TOYDEMIR, P.; KANTARCI, S. X Chromosome Exome Sequencing Reveals a Novel ALG13 Mutation in a Nonsyndromic Intellectual Disability Family with Multiple Affected Male Siblings. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 164A, n. 1, p. 164–169, jan. 2014.

BLAZEK, D.; KOHOUTEK, J.; BARTHOLOMEEUSEN, K.; JOHANSEN, E.; HULINKOVA, P.; LUO, Z.; CIMERMANCIC, P.; ULE, J.; PETERLIN, B. M. The Cyclin K/Cdk12 Complex Maintains Genomic Stability via Regulation of Expression of DNA Damage Response Genes. **Genes & Development**, v. 25, n. 20, p. 2158–2172, 15 out. 2011.

BODIAN, D. L.; SOLOMON, B. D.; KHROMYKH, A.; THACH, D. C.; IYER, R. K.; LINK, K.; BAKER, R. L.; BAVEJA, R.; VOCKLEY, J. G.; NIEDERHUBER, J. E. Diagnosis of an Imprinted-Gene Syndrome by a Novel Bioinformatics Analysis of Whole-Genome Sequences from a Family Trio. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 2, n. 6, p. 530–538, nov. 2014.

BOYCOTT, K. M.; VANSTONE, M. R.; BULMAN, D. E.; MACKENZIE, A. E. Raredisease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 10, p. 681–691, 3 set. 2013.

BOYD, S. D. Diagnostic Applications of High-Throughput DNA Sequencing. **Annual Review of Pathology**, v. 8, p. 381–410, 24 jan. 2013.

BRENNAN, C.; ZHANG, Y.; LEO, C.; FENG, B.; CAUWELS, C.; AGUIRRE, A. J.; KIM, M.; PROTOPOPOV, A.; CHIN, L. High-Resolution Global Profiling of Genomic Alterations with Long Oligonucleotide Micro*array*. **Cancer Research**, v. 64, n. 14, p. 4744–4748, 15 jul. 2004.

BRUNETTI-PIERRI, N.; BERG, J. S.; SCAGLIA, F.; BELMONT, J.; BACINO, C. A.; SAHOO, T.; LALANI, S. R.; GRAHAM, B.; LEE, B.; SHINAWI, M.; SHEN, J.; KANG, S.-H. L.; PURSLEY, A.; LOTZE, T.; KENNEDY, G.; LANSKY-SHAFER, S.; WEAVER, C.; ROEDER, E. R.; GREBE, T. A.; ARNOLD, G. L.; HUTCHISON, T.; REIMSCHISEL, T.; AMATO, S.; GERAGTHY, M. T.; INNIS, J. W.; OBERSZTYN, E.; NOWAKOWSKA, B.; ROSENGREN, S. S.; BADER, P. I.; GRANGE, D. K.; NAQVI, S.; GARNICA, A. D.; BERNES, S. M.; FONG, C.-T.; SUMMERS, A.; WALTERS, W. D.; LUPSKI, J. R.; STANKIEWICZ, P.; CHEUNG, S. W.; PATEL, A. Recurrent Reciprocal 1q21.1 Deletions and Duplications Associated with Microcephaly or Macrocephaly and Developmental and Behavioral Abnormalities. **Nature Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1466–1471, dez. 2008.

CALISKAN, M.; CHONG, J. X.; URICCHIO, L.; ANDERSON, R.; CHEN, P.; SOUGNEZ, C.; GARIMELLA, K.; GABRIEL, S. B.; DEPRISTO, M. A.; SHAKIR, K.; MATERN, D.; DAS, S.; WAGGONER, D.; NICOLAE, D. L.; OBER, C. Exome Sequencing Reveals a Novel Mutation for Autosomal Recessive Non-Syndromic Mental Retardation in the TECR Gene on Chromosome 19p13. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 7, p. 1285–1289, 1 abr. 2011.

CAMPEAU, P. M.; KASPERAVICIUTE, D.; LU, J. T.; BURRAGE, L. C.; KIM, C.; HORI, M.; POWELL, B. R.; STEWART, F.; FÉLIX, T. M.; VAN DEN ENDE, J.; WISNIEWSKA, M.; KAYSERILI, H.; RUMP, P.; NAMPOOTHIRI, S.; AFTIMOS, S.; MEY, A.; NAIR, L. D. V.; BEGLEITER, M. L.; DE BIE, I.; MEENAKSHI, G.; MURRAY, M. L.; REPETTO,

G. M.; GOLABI, M.; BLAIR, E.; MALE, A.; GIULIANO, F.; KARIMINEJAD, A.; NEWMAN, W. G.; BHASKAR, S. S.; DICKERSON, J. E.; KERR, B.; BANKA, S.; GILTAY, J. C.; WIECZOREK, D.; TOSTEVIN, A.; WISZNIEWSKA, J.; CHEUNG, S. W.; HENNEKAM, R. C.; GIBBS, R. A.; LEE, B. H.; SISODIYA, S. M. The Genetic Basis of DOORS Syndrome: An Exome-Sequencing Study. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 1, p. 44–58, jan. 2014.

CAPRIOTTI, E.; CALABRESE, R.; CASADIO, R. Predicting the Insurgence of Human Genetic Diseases Associated to Single Point Protein Mutations with Support Vector Machines and Evolutionary Information. **Bioinformatics**, v. 22, n. 22, p. 2729–2734, 15 nov. 2006.

CARVALHO, B.; OUWERKERK, E.; MEIJER, G. A.; YLSTRA, B. High Resolution Micro*array* Comparative Genomic Hybridisation Analysis Using Spotted Oligonucleotides. **Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 6, p. 644–646, jun. 2004.

CASANOVA, E. L.; CASANOVA, M. F. Genetics studies indicate that neural induction and early neuronal maturation are disturbed in autism. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 19 nov. 2014.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential Binding of Alkylating Fluorochromes in Human Chromosomes. **Experimental Cell Research**, v. 60, n. 3, p. 315–319, jun. 1970.

CHAKRABARTI, L.; KNIGHT, S. J.; FLANNERY, A. V.; DAVIES, K. E. A Candidate Gene for Mild Mental Handicap at the FRAXE Fragile Site. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 2, p. 275–282, fev. 1996.

CHEN, H.-H.; YU, H.-I.; TARN, W.-Y. DDX3 Modulates Neurite Development via Translationally Activating an RNA Regulon Involved in Rac1 Activation. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 38, p. 9792–9804, 21 set. 2016.

CHEN, H.-R.; LIN, G.-T.; HUANG, C.-K.; FANN, M.-J. Cdk12 and Cdk13 Regulate Axonal Elongation through a Common Signaling Pathway That Modulates Cdk5 Expression. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 10–21, nov. 2014.

CHUNG, Y.-J.; JONKERS, J.; KITSON, H.; FIEGLER, H.; HUMPHRAY, S.; SCOTT, C.; HUNT, S.; YU, Y.; NISHIJIMA, I.; VELDS, A.; HOLSTEGE, H.; CARTER, N.; BRADLEY, A. A Whole-Genome Mouse BAC Micro*array* with 1-Mb Resolution for Analysis of DNA Copy Number Changes by *Array* Comparative Genomic Hybridization. **Genome Research**, v. 14, n. 1, p. 188–196, jan. 2004.

COHEN, M. M.; HALL, B. D.; SMITH, D. W.; GRAHAM, C. B.; LAMPERT, K. J. A New Syndrome with Hypotonia, Obesity, Mental Deficiency, and Facial, Oral, Ocular, and Limb Anomalies. **The Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 2, p. 280–284, ago. 1973.

COLLINS, J.; MARVELLE, A.; STEVENSON, R. Sibling Recurrence in Intellectual Disability of Unknown Cause. **Clinical Genetics**, v. 79, n. 5, p. 498–500, maio 2011.

CORBETT, M. A.; BAHLO, M.; JOLLY, L.; AFAWI, Z.; GARDNER, A. E.; OLIVER, K. L.; TAN, S.; COFFEY, A.; MULLEY, J. C.; DIBBENS, L. M.; SIMRI, W.; SHALATA, A.; KIVITY, S.; JACKSON, G. D.; BERKOVIC, S. F.; GECZ, J. A Focal Epilepsy and Intellectual Disability Syndrome Is due to a Mutation in TBC1D24. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, n. 3, p. 371–375, 10 set. 2010a.

CORBETT, M. A.; BAHLO, M.; JOLLY, L.; AFAWI, Z.; GARDNER, A. E.; OLIVER, K. L.; TAN, S.; COFFEY, A.; MULLEY, J. C.; DIBBENS, L. M.; SIMRI, W.; SHALATA, A.; KIVITY, S.; JACKSON, G. D.; BERKOVIC, S. F.; GECZ, J. A Focal Epilepsy and Intellectual Disability Syndrome Is due to a Mutation in TBC1D24. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, n. 3, p. 371–375, 10 set. 2010b.

CRAWFORD, D. C.; ACUÑA, J. M.; SHERMAN, S. L. FMR1 and the Fragile X Syndrome: Human Genome Epidemiology Review. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 3, n. 5, p. 359–371, out. 2001.

DE FALCO, F.; CAINARCA, S.; ANDOLFI, G.; FERRENTINO, R.; BERTI, C.; RODRÍGUEZ CRIADO, G.; RITTINGER, O.; DENNIS, N.; ODENT, S.; RASTOGI, A.; LIEBELT, J.; CHITAYAT, D.; WINTER, R.; JAWANDA, H.; BALLABIO, A.; FRANCO, B.; MERONI, G. X-Linked Opitz Syndrome: Novel Mutations in the *MID1* Gene and Redefinition of the Clinical Spectrum: MID1 Mutations in X-Linked Opitz Syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 120A, n. 2, p. 222–228, 15 jul. 2003.

DE LEEUW, N.; DIJKHUIZEN, T.; HEHIR-KWA, J. Y.; CARTER, N. P.; FEUK, L.; FIRTH, H. V.; KUHN, R. M.; LEDBETTER, D. H.; MARTIN, C. L.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. A.; SCHERER, S. W.; SHAMS, S.; VAN VOOREN, S.; SIJMONS, R.; SWERTZ, M.; HASTINGS, R. Diagnostic Interpretation of *Array* Data Using Public Databases and Internet Sources. **Human Mutation**, v. 33, n. 6, p. 930–940, jun. 2012.

DE LIGT, J.; WILLEMSEN, M. H.; VAN BON, B. W. M.; KLEEFSTRA, T.; YNTEMA, H. G.; KROES, T.; VULTO-VAN SILFHOUT, A. T.; KOOLEN, D. A.; DE VRIES, P.; GILISSEN, C.; DEL ROSARIO, M.; HOISCHEN, A.; SCHEFFER, H.; DE VRIES, B. B. A.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A.; VISSERS, L. E. L. M. Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 20, p. 1921–1929, 15 nov. 2012.

DE VRIES, B. B. A.; PFUNDT, R.; LEISINK, M.; KOOLEN, D. A.; VISSERS, L. E. L. M.; JANSSEN, I. M.; REIJMERSDAL, S. van; NILLESEN, W. M.; HUYS, E. H. L. P. G.; LEEUW, N. de; SMEETS, D.; SISTERMANS, E. A.; FEUTH, T.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. A.; VAN KESSEL, A. G.; SCHOENMAKERS, E. F. P. M.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A. Diagnostic Genome Profiling in Mental Retardation. **The American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 4, p. 606–616, out. 2005.

DE VRIES, B. B. A.; WINTER, R.; SCHINZEL, A.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. Telomeres: A Diagnosis at the End of the Chromosomes. **Journal of Medical Genetics**, v. 40, n. 6, p. 385–398, jun. 2003.

DECIPHERING DEVELOPMENTAL DISORDERS STUDY. Large-Scale Discovery of Novel Genetic Causes of Developmental Disorders. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 223–228, 12 mar. 2015.

DUPLOMB, L.; DUVET, S.; PICOT, D.; JEGO, G.; EL CHEHADEH-DJEBBAR, S.; MARLE, N.; GIGOT, N.; ARAL, B.; CARMIGNAC, V.; THEVENON, J.; LOPEZ, E.; RIVIERE, J.-B.; KLEIN, A.; PHILIPPE, C.; DROIN, N.; BLAIR, E.; GIRODON, F.; DONADIEU, J.; BELLANNE-CHANTELOT, C.; DELVA, L.; MICHALSKI, J.-C.; SOLARY, E.; FAIVRE, L.; FOULQUIER, F.; THAUVIN-ROBINET, C. Cohen Syndrome
Is Associated with Major Glycosylation Defects. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 9, p. 2391–2399, 1 maio 2014.

DURKIN, M. The Epidemiology of Developmental Disabilities in Low-Income Countries. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 8, n. 3, p. 206–211, 2002.

EDWARDS, J. H.; HARNDEN, D. G.; CAMERON, A. H.; CROSSE, V. M.; WOLFF, O. H. A New Trisomic Syndrome. Lancet (London, England), v. 1, n. 7128, p. 787–790, 9 abr. 1960.

EL CHEHADEH, S.; ARAL, B.; GIGOT, N.; THAUVIN-ROBINET, C.; DONZEL, A.; DELRUE, M.-A.; LACOMBE, D.; DAVID, A.; BURGLEN, L.; PHILIP, N.; MONCLA, A.; CORMIER-DAIRE, V.; RIO, M.; EDERY, P.; VERLOES, A.; BONNEAU, D.; AFENJAR, A.; JACQUETTE, A.; HERON, D.; SARDA, P.; PINSON, L.; DORAY, B.; VIGNERON, J.; LEHEUP, B.; FRANCES-GUIDET, A.-M.; DIENNE, G.; HOLDER, M.; MASUREL-PAULET, A.; HUET, F.; TEYSSIER, J.-R.; FAIVRE, L. Search for the Best Indicators for the Presence of a VPS13B Gene Mutation and Confirmation of Diagnostic Criteria in a Series of 34 Patients Genotyped for Suspected Cohen Syndrome. Journal of Medical Genetics, v. 47, n. 8, p. 549–553, ago. 2010.

ENGLISH, A. C.; RICHARDS, S.; HAN, Y.; WANG, M.; VEE, V.; QU, J.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; REID, J. G.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A. Mind the Gap: Upgrading Genomes with Pacific Biosciences RS Long-Read Sequencing Technology. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e47768, 21 nov. 2012.

EUROEPINOMICS-RES CONSORTIUM; EPILEPSY PHENOME/GENOME PROJECT; EPI4K CONSORTIUM. De Novo Mutations in Synaptic Transmission Genes Including DNM1 Cause Epileptic Encephalopathies. **American Journal of Human Genetics**, v. 95, n. 4, p. 360–370, 2 out. 2014.

EURO-MRX. **European Mental Retardation Consortium.** Disponível em: <a href="http://www.euromrx.com/en/consortium.html">http://www.euromrx.com/en/consortium.html</a>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

FEDURCO, M. BTA, a Novel Reagent for DNA Attachment on Glass and Efficient Generation of Solid-Phase Amplified DNA Colonies. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 3, p. e22–e22, 6 fev. 2006.

FELIX, T. M.; DE MENEZES KARAM, S.; DELLA ROSA, V. A.; MORAES, A. M. S. M. DOOR Syndrome: Report of Three Additional Cases. **Clinical Dysmorphology**, v. 11, n. 2, p. 133–138, abr. 2002.

FERGUSON-SMITH, M. A. Cytogenetics in Man. **Archives of Internal Medicine**, v. 105, n. 4, p. 627, 1 abr. 1960.

FERGUSON-SMITH, M. A. Chromosomes and human disease. **Progress in Medical Genetics**, Cap. 8, v.1, New York: Grune & Stratton, 1961.

FERGUSON-SMITH, M. A. History and Evolution of Cytogenetics. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, dez. 2015.

FERREIRA, P. G.; OTI, M.; BARANN, M.; WIELAND, T.; EZQUINA, S.; FRIEDLÄNDER, M. R.; RIVAS, M. A.; ESTEVE-CODINA, A.; ESTIVILL, X.; GUIGÓ, R.; DERMITZAKIS, E.; ANTONARAKIS, S.; MEITINGER, T.; STROM, T. M.; PALOTIE, A.; FRANÇOIS DELEUZE, J.; SUDBRAK, R.; LERACH, H.; GUT, I.; SYVÄNEN, A.-C.; GYLLENSTEN, U.; SCHREIBER, S.; ROSENSTIEL, P.; BRUNNER, H.; VELTMAN, J.; HOEN, P. A. C. .; JAN VAN OMMEN, G.; CARRACEDO, A.; BRAZMA, A.; FLICEK, P.; CAMBON-THOMSEN, A.; MANGION, J.; BENTLEY, D.; HAMOSH, A.; ROSENSTIEL, P.; STROM, T. M.; LAPPALAINEN, T.; GUIGÓ, R.; SAMMETH, M. Sequence variation between 462 human individuals fine-tunes functional sites of RNA processing. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32406, 12 set. 2016.

FERRENTINO, R.; BASSI, M. T.; CHITAYAT, D.; TABOLACCI, E.; MERONI, G. MID1 Mutation Screening in a Large Cohort of Opitz G/BBB Syndrome Patients: Twenty-Nine Novel Mutations Identified. **Human Mutation**, v. 28, n. 2, p. 206–207, fev. 2007.

FIELD, M.; TARPEY, P. S.; SMITH, R.; EDKINS, S.; O'MEARA, S.; STEVENS, C.; TOFTS, C.; TEAGUE, J.; BUTLER, A.; DICKS, E.; BARTHORPE, S.; BUCK, G.; COLE, J.; GRAY, K.; HALLIDAY, K.; HILLS, K.; JENKINSON, A.; JONES, D.; MENZIES, A.; MIRONENKO, T.; PERRY, J.; RAINE, K.; RICHARDSON, D.; SHEPHERD, R.; SMALL, A.; VARIAN, J.; WEST, S.; WIDAA, S.; MALLYA, U.; WOOSTER, R.; MOON, J.; LUO, Y.; HUGHES, H.; SHAW, M.; FRIEND, K. L.; CORBETT, M.; TURNER, G.; PARTINGTON, M.; MULLEY, J.; BOBROW, M.; SCHWARTZ, C.; STEVENSON, R.; GECZ, J.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A.; RAYMOND, F. L. Mutations in the BRWD3 Gene Cause X-Linked Mental Retardation Associated with Macrocephaly. American Journal of Human Genetics, v. 81, n. 2, p. 367–374, ago. 2007.

FLEMMING, W. Ueber die chromosomenzah beim Menshen. **Anatomischer Anzeiger**, v. 14, p. 171-174, 1898.

FLICEK, P.; BIRNEY, E. Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. **Nature Methods**, v. 6, n. 11s, p. S6–S12, nov. 2009.

FLINT, J.; KNIGHT, S. The Use of Telomere Probes to Investigate Submicroscopic Rearrangements Associated with Mental Retardation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 3, p. 310–316, jun. 2003.

FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. The Chromosomes of Man. **Nature**, v. 178, n. 4541, p. 1020–1023, 10 nov. 1956.

FORD, C. E.; JONES, K. W.; MILLER, O. J.; MITTWOCH, U.; PENROSE, L. S.; RIDLER, M.; SHAPIRO, A. The Chromosomes in a Patient Showing Both Mongolism and the Klinefelter Syndrome. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7075, p. 709–710, 4 abr. 1959a.

FORD, C. E.; JONES, K. W.; POLANI, P. E.; DE ALMEIDA, J. C.; BRIGGS, J. H. A Sex-Chromosome Anomaly in a Case of Gonadal Dysgenesis (Turner's Syndrome). Lancet (London, England), v. 1, n. 7075, p. 711–713, 4 abr. 1959b.

FRIEDMAN, J. M.; BAROSS, Á.; DELANEY, A. D.; ALLY, A.; ARBOUR, L.; ASANO, J.; BAILEY, D. K.; BARBER, S.; BIRCH, P.; BROWN-JOHN, M.; CAO, M.; CHAN, S.; CHAREST, D. L.; FARNOUD, N.; FERNANDES, N.; FLIBOTTE, S.; GO, A.; GIBSON, W. T.; HOLT, R. A.; JONES, S. J. M.; KENNEDY, G. C.; KRZYWINSKI, M.; LANGLOIS, S.; LI, H. I.; MCGILLIVRAY, B. C.; NAYAR, T.; PUGH, T. J.; RAJCAN-SEPAROVIC, E.; SCHEIN, J. E.; SCHNERCH, A.; SIDDIQUI, A.; VAN ALLEN, M. I.; WILSON, G.; YONG, S.-L.; ZAHIR, F.; EYDOUX, P.; MARRA, M. A. Oligonucleotide

Micro*array* Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation. **The American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 3, p. 500–513, set. 2006.

FROYEN, G.; CORBETT, M.; VANDEWALLE, J.; JARVELA, I.; LAWRENCE, O.; MELDRUM, C.; BAUTERS, M.; GOVAERTS, K.; VANDELEUR, L.; VAN ESCH, H.; CHELLY, J.; SANLAVILLE, D.; VAN BOKHOVEN, H.; ROPERS, H.-H.; LAUMONNIER, F.; RANIERI, E.; SCHWARTZ, C. E.; ABIDI, F.; TARPEY, P. S.; FUTREAL, P. A.; WHIBLEY, A.; RAYMOND, F. L.; STRATTON, M. R.; FRYNS, J.-P.; SCOTT, R.; PEIPPO, M.; SIPPONEN, M.; PARTINGTON, M.; MOWAT, D.; FIELD, M.; HACKETT, A.; MARYNEN, P.; TURNER, G.; GÉCZ, J. Submicroscopic Duplications of the Hydroxysteroid Dehydrogenase HSD17B10 and the E3 Ubiquitin Ligase HUWE1 Are Associated with Mental Retardation. American Journal of Human Genetics, v. 82, n. 2, p. 432–443, fev. 2008.

FUKAI, R.; SAITSU, H.; OKAMOTO, N.; SAKAI, Y.; FATTAL-VALEVSKI, A.; MASAAKI, S.; KITAI, Y.; TORIO, M.; KOJIMA-ISHII, K.; IHARA, K.; CHERNUHA, V.; NAKASHIMA, M.; MIYATAKE, S.; TANAKA, F.; MIYAKE, N.; MATSUMOTO, N. De novo missense mutations in NALCN cause developmental and intellectual impairment with hypotonia. **Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 5, p. 451–455, maio 2016.

GARSHASBI, M.; HADAVI, V.; HABIBI, H.; KAHRIZI, K.; KARIMINEJAD, R.; BEHJATI, F.; TZSCHACH, A.; NAJMABADI, H.; ROPERS, H. H.; KUSS, A. W. A Defect in the TUSC3 Gene Is Associated with Autosomal Recessive Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 5, p. 1158–1164, maio 2008.

GECZ, J.; GEDEON, A. K.; SUTHERLAND, G. R.; MULLEY, J. C. Identification of the Gene FMR2, Associated with FRAXE Mental Retardation. **Nature Genetics**, v. 13, n. 1, p. 105–108, maio 1996.

GENOHUB INC. **Whole Exome Sequencing Guide:** Kits, services, analysis, costs and best practices. 2012-2015. Disponível em: <a href="https://genohub.com/exome-sequencing-library-preparation/">https://genohub.com/exome-sequencing-library-preparation/</a>. Acesso em: 8 jun. 2016.

GILISSEN, C.; HEHIR-KWA, J. Y.; THUNG, D. T.; VAN DE VORST, M.; VAN BON, B. W. M.; WILLEMSEN, M. H.; KWINT, M.; JANSSEN, I. M.; HOISCHEN, A.; SCHENCK, A.; LEACH, R.; KLEIN, R.; TEARLE, R.; BO, T.; PFUNDT, R.; YNTEMA, H. G.; DE VRIES, B. B. A.; KLEEFSTRA, T.; BRUNNER, H. G.; VISSERS, L. E. L. M.; VELTMAN, J. A. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 344–347, 4 jun. 2014.

GRIGGS, B. L.; LADD, S.; SAUL, R. A.; DUPONT, B. R.; SRIVASTAVA, A. K. Dedicator of Cytokinesis 8 Is Disrupted in Two Patients with Mental Retardation and Developmental Disabilities. **Genomics**, v. 91, n. 2, p. 195–202, fev. 2008.

GRIMM, T.; WESSELHOEFT, H. [The genetic aspects of Williams-Beuren syndrome and the isolated form of the supravalvular aortic stenosis. Investigation of 128 families (author's transl)]. **Zeitschrift Fur Kardiologie**, v. 69, n. 3, p. 168–172, mar. 1980.

GRISART, B.; WILLATT, L.; DESTRÉE, A.; FRYNS, J.-P.; RACK, K.; DE RAVEL, T.; ROSENFELD, J.; VERMEESCH, J. R.; VERELLEN-DUMOULIN, C.; SANDFORD, R. 17q21.31 Microduplication Patients Are Characterised by Behavioural Problems and Poor Social Interaction. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 8, p. 524–530, ago. 2009.

GUENEAU, L.; DUPLOMB, L.; SARDA, P.; HAMEL, C.; ARAL, B.; CHEHADEH, S. E.; GIGOT, N.; ST-ONGE, J.; CALLIER, P.; THEVENON, J.; HUET, F.; CARMIGNAC, V.; DROIN, N.; FAIVRE, L.; THAUVIN-ROBINET, C. Congenital Neutropenia with Retinopathy, a New Phenotype without Intellectual Deficiency or Obesity Secondary to VPS13B Mutations. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 164A, n. 2, p. 522–527, fev. 2014.

GUSTAVSON, K.-H. Prevalence and aetiology of congenital birth defects, infant mortality and mental retardation in Lahore, Pakistan: A prospective cohort study. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 6, p. 769–774, 1 jun. 2005.

HAGENS, O.; DUBOS, A.; ABIDI, F.; BARBI, G.; VAN ZUTVEN, L.; HOELTZENBEIN, M.; TOMMERUP, N.; MORAINE, C.; FRYNS, J.-P.; CHELLY, J.; VAN BOKHOVEN, H.; GÉCZ, J.; DOLLFUS, H.; ROPERS, H.-H.; SCHWARTZ, C. E.; DE CASSIA STOCCO DOS SANTOS, R.; KALSCHEUER, V.; HANAUER, A. Disruptions of the Novel KIAA1202 Gene Are Associated with X-Linked Mental Retardation. **Human Genetics**, v. 118, n. 5, p. 578–590, jan. 2006.

HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. Fragile X syndrome. In: HOWLIN, P.; UDWIN, O. (Ed.). **Outcomes in Neurodevelopmental and Genetic Disorders**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. p. 198–219.

HALL, N. G.; KLENOTIC, P.; ANAND-APTE, B.; APTE, S. S. ADAMTSL-3/punctin-2, a Novel Glycoprotein in Extracellular Matrix Related to the ADAMTS Family of Metalloproteases. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 22, n. 6, p. 501–510, nov. 2003b.

HAMDAN, F. F.; GAUTHIER, J.; ARAKI, Y.; LIN, D.-T.; YOSHIZAWA, Y.; HIGASHI, K.; PARK, A.-R.; SPIEGELMAN, D.; DOBRZENIECKA, S.; PITON, A.; TOMITORI, H.; DAOUD, H.; MASSICOTTE, C.; HENRION, E.; DIALLO, O.; SHEKARABI, M.; MARINEAU, C.; SHEVELL, M.; MARANDA, B.; MITCHELL, G.; NADEAU, A.; D'ANJOU, G.; VANASSE, M.; SROUR, M.; LAFRENIÈRE, R. G.; DRAPEAU, P.; LACAILLE, J. C.; KIM, E.; LEE, J.-R.; IGARASHI, K.; HUGANIR, R. L.; ROULEAU, G. A.; MICHAUD, J. L. Excess of De Novo Deleterious Mutations in Genes Associated with Glutamatergic Systems in Nonsyndromic Intellectual Disability. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 3, p. 306–316, mar. 2011.

HAMDAN, F. F.; GAUTHIER, J.; SPIEGELMAN, D.; NOREAU, A.; YANG, Y.; PELLERIN, S.; DOBRZENIECKA, S.; CÔTÉ, M.; PERREAU-LINCK, E.; CARMANT, L.; D'ANJOU, G.; FOMBONNE, É.; ADDINGTON, A. M.; RAPOPORT, J. L.; DELISI, L. E.; KREBS, M.-O.; MOUAFFAK, F.; JOOBER, R.; MOTTRON, L.; DRAPEAU, P.; MARINEAU, C.; LAFRENIÈRE, R. G.; LACAILLE, J. C.; ROULEAU, G. A.; MICHAUD, J. L. Mutations in *SYNGAP1* in Autosomal Nonsyndromic Mental Retardation. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 6, p. 599–605, 5 fev. 2009a.

HAMDAN, F. F.; PITON, A.; GAUTHIER, J.; LORTIE, A.; DUBEAU, F.; DOBRZENIECKA, S.; SPIEGELMAN, D.; NOREAU, A.; PELLERIN, S.; CÔTÉ, M.; HENRION, E.; FOMBONNE, É.; MOTTRON, L.; MARINEAU, C.; DRAPEAU, P.; LAFRENIÈRE, R. G.; LACAILLE, J. C.; ROULEAU, G. A.; MICHAUD, J. L. De Novo *STXBP1* Mutations in Mental Retardation and Nonsyndromic Epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 6, p. 748–753, jun. 2009b.

HAMDAN, F. F.; SROUR, M.; CAPO-CHICHI, J.-M.; DAOUD, H.; NASSIF, C.; PATRY, L.; MASSICOTTE, C.; AMBALAVANAN, A.; SPIEGELMAN, D.; DIALLO, O.; HENRION, E.; DIONNE-LAPORTE, A.; FOUGERAT, A.; PSHEZHETSKY, A. V.; VENKATESWARAN, S.; ROULEAU, G. A.; MICHAUD, J. L. De Novo Mutations in Moderate or Severe Intellectual Disability. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 10, p. e1004772, 30 out. 2014.

HARRIS, J. C. Intellectual disability: understanding its development, causes, classification, evaluation, and treatment. New York: Oxford University Press, 2006. P. 42-98.

HASHIMOTO, S.; BOISSEL, S.; ZARHRATE, M.; RIO, M.; MUNNICH, A.; EGLY, J.-M.; COLLEAUX, L. MED23 Mutation Links Intellectual Disability to Dysregulation of Immediate Early Gene Expression. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1161–1163, 26 ago. 2011.

HENNIES, H. C.; RAUCH, A.; SEIFERT, W.; SCHUMI, C.; MOSER, E.; AL-TAJI, E.; TARIVERDIAN, G.; CHRZANOWSKA, K. H.; KRAJEWSKA-WALASEK, M.; RAJAB, A.; GIUGLIANI, R.; NEUMANN, T. E.; ECKL, K. M.; KARBASIYAN, M.; REIS, A.; HORN, D. Allelic Heterogeneity in the COH1 Gene Explains Clinical Variability in Cohen Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 1, p. 138–145, jul. 2004.

HIGGINS, J. J.; PUCILOWSKA, J.; LOMBARDI, R. Q.; ROONEY, J. P. A Mutation in a Novel ATP-Dependent Lon Protease Gene in a Kindred with Mild Mental Retardation. **Neurology**, v. 63, n. 10, p. 1927–1931, 23 nov. 2004.

HOCHSTENBACH, R.; VAN BINSBERGEN, E.; ENGELEN, J.; NIEUWINT, A.; POLSTRA, A.; PODDIGHE, P.; RUIVENKAMP, C.; SIKKEMA-RADDATZ, B.; SMEETS, D.; POOT, M. *Array* Analysis and Karyotyping: Workflow Consequences Based on a Retrospective Study of 36,325 Patients with Idiopathic Developmental Delay in the Netherlands. **European Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 4, p. 161–169, jul. 2009.

HU, H.; HAAS, S. A.; CHELLY, J.; VAN ESCH, H.; RAYNAUD, M.; DE BROUWER, A. P. M.; WEINERT, S.; FROYEN, G.; FRINTS, S. G. M.; LAUMONNIER, F.; ZEMOJTEL, T.; LOVE, M. I.; RICHARD, H.; EMDE, A.-K.; BIENEK, M.; JENSEN, C.; HAMBROCK, M.; FISCHER, U.; LANGNICK, C.; FELDKAMP, M.; WISSINK-LINDHOUT, W.; LEBRUN, N.; CASTELNAU, L.; RUCCI, J.; MONTJEAN, R.; DORSEUIL, O.; BILLUART, P.; STUHLMANN, T.; SHAW, M.; CORBETT, M. A.; GARDNER, A.; WILLIS-OWEN, S.; TAN, C.; FRIEND, K. L.; BELET, S.; VAN ROOZENDAAL, K. E. P.; JIMENEZ-POCQUET, M.; MOIZARD, M.-P.; RONCE, N.; SUN, R.; O'KEEFFE, S.; CHENNA, R.; VAN BOMMEL, A.; GOKE, J.; HACKETT, A.; FIELD, M.; CHRISTIE, L.; BOYLE, J.; HAAN, E.; NELSON, J.; TURNER, G.; BAYNAM, G.; GILLESSEN-KAESBACH. G.: MÜLLER. U.: STEINBERGER. D.: BUDNY. B.: BADURA-STRONKA. M.; LATOS-BIELEŃSKA, A.; OUSAGER, L. B.; WIEACKER, P.; RODRÍGUEZ CRIADO, G.; BONDESON, M.-L.; ANNERÉN, G.; DUFKE, A.; COHEN, M.; VAN MALDERGEM, L.; VINCENT-DELORME, C.; ECHENNE, B.; SIMON-BOUY, B.; KLEEFSTRA, T.; WILLEMSEN, M.; FRYNS, J.-P.; DEVRIENDT, K.; ULLMANN, R.; VINGRON, M.; WROGEMANN, K.; WIENKER, T. F.; TZSCHACH, A.; VAN BOKHOVEN, H.; GECZ, J.; JENTSCH, T. J.; CHEN, W.; ROPERS, H.-H.; KALSCHEUER, V. M. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 133–148, jan. 2016.

HUGHES, A. Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. **Quar J. Micro. Sci.**, v. 93, p. 207-220, 1952.

HUMEAU, Y.; GAMBINO, F.; CHELLY, J.; VITALE, N. X-Linked Mental Retardation: Focus on Synaptic Function and Plasticity. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–14, abr. 2009.

HUS, T. C. Mammalian chromosomes in vitro. I. The karyotype of man. **J. hered**, v.43, p. 167-172, 1952.

JACOBS, P. A.; BAIKIE, A. G.; COURT BROWN, W. M.; STRONG, J. A. The Somatic Chromosomes in Mongolism. Lancet (London, England), v. 1, n. 7075, p. 710-714, abr. 1959.

JAILLARD, S.; DRUNAT, S.; BENDAVID, C.; ABOURA, A.; ETCHEVERRY, A.; JOURNEL, H.; DELAHAYE, A.; PASQUIER, L.; BONNEAU, D.; TOUTAIN, A.; BURGLEN, L.; GUICHET, A.; PIPIRAS, E.; GILBERT-DUSSARDIER, B.; BENZACKEN, B.; MARTIN-COIGNARD, D.; HENRY, C.; DAVID, A.; LUCAS, J.; MOSSER, J.; DAVID, V.; ODENT, S.; VERLOES, A.; DUBOURG, C. Identification of Gene Copy Number Variations in Patients with Mental Retardation Using *Array*-CGH: Novel Syndromes in a Large French Series. **European Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 2, p. 66–75, mar. 2010.

JAILLARD, S.; DUBOURG, C.; GERARD-BLANLUET, M.; DELAHAYE, A.; PASQUIER, L.; DUPONT, C.; HENRY, C.; TABET, A.-C.; LUCAS, J.; ABOURA, A.; DAVID, V.; BENZACKEN, B.; ODENT, S.; PIPIRAS, E. 2q23.1 Microdeletion Identified by *Array* Comparative Genomic Hybridisation: An Emerging Phenotype with Angelman-like Features? **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 12, p. 847–855, 1 dez. 2009.

JAMAIN, S.; QUACH, H.; BETANCUR, C.; RÅSTAM, M.; COLINEAUX, C.; GILLBERG, I. C.; SODERSTROM, H.; GIROS, B.; LEBOYER, M.; GILLBERG, C.; BOURGERON, T.; GILLBERG, C.; RÅSTAM, M.; GILLBERG, C.; NYDÉN, A.; SÖDERSTRÖM, H.; LEBOYER, M.; BETANCUR, C.; PHILIPPE, A.; GIROS, B.; COLINEAUX, C.; COHEN, D.; CHABANE, N.; MOUREN-SIMÉONI, M.-C.; BRICE, A.; SPONHEIM, E.; SPURKLAND, I.; SKJELDAL, O. H.; COLEMAN, M.; PEARL, P. L.; COHEN, I. L.; TSIOURIS, J.; ZAPPELLA, M.; MENCHETTI, G.; POMPELLA, A.; ASCHAUER, H.; VAN MALDERGEM, L. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. **Nature Genetics**, v. 34, n. 1, p. 27–29, maio 2003.

JAZAYERI, R.; HU, H.; FATTAHI, Z.; MUSANTE, L.; ABEDINI, S. S.; HOSSEINI, M.; WIENKER, T. F.; ROPERS, H. H.; NAJMABADI, H.; KAHRIZI, K. Exome Sequencing and Linkage Analysis Identified Novel Candidate Genes in Recessive Intellectual Disability Associated with Ataxia. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 10, p. 670–682, out. 2015.

JI, X.; XING, Y.; XU, Y.; LIU, Y.; CHEN, Y.; TAO, J.; XIAO, B. A Novel Mutation in MID1 in a Patient with X-Linked Opitz G/BBB Syndrome. **Gene**, v. 537, n. 1, p. 140–142, mar. 2014.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J. W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D. Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5083, p. 818–821, 30 out. 1992.

KAUPMANN, K.; MALITSCHEK, B.; SCHULER, V.; HEID, J.; FROESTL, W.; BECK, P.; MOSBACHER, J.; BISCHOFF, S.; KULIK, A.; SHIGEMOTO, R.; KARSCHIN, A.; BETTLER, B. GABA(B)-Receptor Subtypes Assemble into Functional Heteromeric Complexes. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 683–687, 17 dez. 1998.

KERR, D. I.; ONG, J. GABAB Receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 67, n. 2, p. 187–246, 1995.

KIEZUN, A.; GARIMELLA, K.; DO, R.; STITZIEL, N. O.; NEALE, B. M.; MCLAREN, P. J.; GUPTA, N.; SKLAR, P.; SULLIVAN, P. F.; MORAN, J. L.; HULTMAN, C. M.; LICHTENSTEIN, P.; MAGNUSSON, P.; LEHNER, T.; SHUGART, Y. Y.; PRICE, A. L.; DE BAKKER, P. I. W.; PURCELL, S. M.; SUNYAEV, S. R. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 623–630, 29 maio 2012.

KING, B H; TOTH, K; HODAPP, R M; DYKENS EM. Intellectual Disability. **Comprehensive Textbook of Psychiatry**, 9. Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 3444-3474, 2009

KIRCHHOFF, M.; BISGAARD, A.-M.; DUNO, M.; HANSEN, F. J.; SCHWARTZ, M. A 17q21.31 Microduplication, Reciprocal to the Newly Described 17q21.31 Microdeletion, in a Girl with Severe Psychomotor Developmental Delay and Dysmorphic Craniofacial Features. **European Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 4, p. 256–263, ago. 2007.

KNIGHT, S. J.; REGAN, R.; NICOD, A.; HORSLEY, S. W.; KEARNEY, L.; HOMFRAY, T.; WINTER, R. M.; BOLTON, P.; FLINT, J. Subtle Chromosomal Rearrangements in Children with Unexplained Mental Retardation. **Lancet (London, England)**, v. 354, n. 9191, p. 1676–1681, 13 nov. 1999.

KOOLEN, D. A.; PFUNDT, R.; DE LEEUW, N.; HEHIR-KWA, J. Y.; NILLESEN, W. M.; NEEFS, I.; SCHELTINGA, I.; SISTERMANS, E.; SMEETS, D.; BRUNNER, H. G.; VAN KESSEL, A. G.; VELTMAN, J. A.; DE VRIES, B. B. A. Genomic Micro*array*s in Mental Retardation: A Practical Workflow for Diagnostic Applications. **Human Mutation**, v. 30, n. 3, p. 283–292, mar. 2009.

KORBEL, J. O.; URBAN, A. E.; AFFOURTIT, J. P.; GODWIN, B.; GRUBERT, F.; SIMONS, J. F.; KIM, P. M.; PALEJEV, D.; CARRIERO, N. J.; DU, L.; TAILLON, B. E.; CHEN, Z.; TANZER, A.; SAUNDERS, A. C. E.; CHI, J.; YANG, F.; CARTER, N. P.; HURLES, M. E.; WEISSMAN, S. M.; HARKINS, T. T.; GERSTEIN, M. B.; EGHOLM, M.; SNYDER, M. Paired-End Mapping Reveals Extensive Structural Variation in the Human Genome. **Science**, v. 318, n. 5849, p. 420–426, 19 out. 2007.

KOROĞLU, Ç.; SEVEN, M.; TOLUN, A. Recessive Truncating NALCN Mutation in Infantile Neuroaxonal Dystrophy with Facial Dysmorphism. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 8, p. 515–520, ago. 2013.

KRIEK, M.; KNIJNENBURG, J.; WHITE, S. J.; ROSENBERG, C.; DEN DUNNEN, J. T.; VAN OMMEN, G.-J. B.; TANKE, H. J.; BREUNING, M. H.; SZUHAI, K. Diagnosis

of Genetic Abnormalities in Developmentally Delayed Patients: A New Strategy Combining MLPA and *Array*-CGH. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 143A, n. 6, p. 610–614, 15 mar. 2007.

KUROTAKI, N.; STANKIEWICZ, P.; WAKUI, K.; NIIKAWA, N.; LUPSKI, J. R. Sotos Syndrome Common Deletion Is Mediated by Directly Oriented Subunits within Inverted Sos-REP Low-Copy Repeats. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 4, p. 535–542, 15 fev. 2005.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.: SOUGNEZ, C.: STANGE-THOMANN, N.: STOJANOVIC, N.: SUBRAMANIAN, A.: WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J.-F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLÖCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H.-C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G. R.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F. A.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S.-P.; YEH, R.-

F.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001.

LAUMONNIER, F.; CUTHBERT, P. C.; GRANT, S. G. N. The Role of Neuronal Complexes in Human X-Linked Brain Diseases. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 2, p. 205–220, fev. 2007.

LAVER, T.; HARRISON, J.; O'NEILL, P. A.; MOORE, K.; FARBOS, A.; PASZKIEWICZ, K.; STUDHOLME, D. J. Assessing the Performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 3, p. 1–8, mar. 2015.

LE GOFF, C.; MORICE-PICARD, F.; DAGONEAU, N.; WANG, L. W.; PERROT, C.; CROW, Y. J.; BAUER, F.; FLORI, E.; PROST-SQUARCIONI, C.; KRAKOW, D.; GE, G.; GREENSPAN, D. S.; BONNET, D.; LE MERRER, M.; MUNNICH, A.; APTE, S. S.; CORMIER-DAIRE, V. ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF- $\beta$  bioavailability regulation. **Nature Genetics**, v. 40, n. 9, p. 1119–1123, set. 2008.

LEBEL, R. R.; MAY, M.; POULS, S.; LUBS, H. A.; STEVENSON, R. E.; SCHWARTZ, C. E. Non-Syndromic X-Linked Mental Retardation Associated with a Missense Mutation (P312L) in the FGD1 Gene. **Clinical Genetics**, v. 61, n. 2, p. 139–145, fev. 2002.

LEDBETTER, D. H.; MARTIN, C. L. Cryptic Telomere Imbalance: A 15-Year Update. **American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics**, v. 145C, n. 4, p. 327–334, 15 nov. 2007.

LEHRKE, R. Theory of X-Linkage of Major Intellectual Traits. **American Journal of Mental Deficiency**, v. 76, n. 6, p. 611–619, maio 1972.

LEHRKE, R. G. X-Linked Mental Retardation and Verbal Disability. **Birth Defects Original Article Series**, v. 10, n. 1, p. 1–100, 1974.

LEJEUNE, J.; TURPIN, R.; GAUTIER, M. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. **Bulletin De l'Académie Nationale De Médecine**, v. 143, n. 11–12, p. 256–265, 7 abr. 1959.

LEONARD, H.; WEN, X. The Epidemiology of Mental Retardation: Challenges and Opportunities in the New Millennium. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 8, n. 3, p. 117–134, 2002.

LEVY, S.; SUTTON, G.; NG, P. C.; FEUK, L.; HALPERN, A. L.; WALENZ, B. P.; AXELROD, N.; HUANG, J.; KIRKNESS, E. F.; DENISOV, G.; LIN, Y.; MACDONALD, J. R.; PANG, A. W. C.; SHAGO, M.; STOCKWELL, T. B.; TSIAMOURI, A.; BAFNA, V.; BANSAL, V.; KRAVITZ, S. A.; BUSAM, D. A.; BEESON, K. Y.; MCINTOSH, T. C.; REMINGTON, K. A.; ABRIL, J. F.; GILL, J.; BORMAN, J.; ROGERS, Y.-H.; FRAZIER, M. E.; SCHERER, S. W.; STRAUSBERG, R. L.; VENTER, J. C. The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. **PLoS Biology**, v. 5, n. 10, p. e254, 4 set. 2007. LI, H.; HOMER, N. A Survey of Sequence Alignment Algorithms for next-Generation Sequencing. **Briefings in Bioinformatics**, v. 11, n. 5, p. 473–483, 1 set. 2010.

LI, R.; LI, Y.; FANG, X.; YANG, H.; WANG, J.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. SNP Detection for Massively Parallel Whole-Genome Resequencing. **Genome Research**, v. 19, n. 6, p. 1124–1132, 1 jun. 2009.

LICHTER, P.; TANG, C. J.; CALL, K.; HERMANSON, G.; EVANS, G. A.; HOUSMAN, D.; WARD, D. C. High-Resolution Mapping of Human Chromosome 11 by in Situ Hybridization with Cosmid Clones. **Science (New York, N.Y.)**, v. 247, n. 4938, p. 64–69, 5 jan. 1990.

LOPES, F.; BARBOSA, M.; AMEUR, A.; SOARES, G.; DE SÁ, J.; DIAS, A. I.; OLIVEIRA, G.; CABRAL, P.; TEMUDO, T.; CALADO, E.; CRUZ, I. F.; VIEIRA, J. P.; OLIVEIRA, R.; ESTEVES, S.; SAUER, S.; JONASSON, I.; SYVÄNEN, A.-C.; GYLLENSTEN, U.; PINTO, D.; MACIEL, P. Identification of Novel Genetic Causes of Rett Syndrome- *like* Phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 3, p. 190–199, mar. 2016.

LU, B.; SU, Y.; DAS, S.; LIU, J.; XIA, J.; REN, D. The Neuronal Channel NALCN Contributes Resting Sodium Permeability and Is Required for Normal Respiratory Rhythm. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 371–383, 20 abr. 2007.

LU, T.; CHEN, R.; COX, T. C.; MOLDRICH, R. X.; KURNIAWAN, N.; TAN, G.; PERRY, J. K.; ASHWORTH, A.; BARTLETT, P. F.; XU, L.; ZHANG, J.; LU, B.; WU, M.; SHEN, Q.; LIU, Y.; RICHARDS, L. J.; XIONG, Z. X-Linked Microtubule-Associated Protein, Mid1, Regulates Axon Development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 47, p. 19131–19136, 19 nov. 2013.

MACKENROTH, L.; RUMP, A.; LORENZ, P.; SCHRÖCK, E.; TZSCHACH, A. Novel ADAMTSL2-Mutations in a Patient with Geleophysic Dysplasia Type I: **Clinical Dysmorphology**, v. 25, n. 3, p. 106–109, jul. 2016.

MAKINO, S.; NISHIMURA, I. Water-Pretreatment Squash Technic; a New and Simple Practical Method for the Chromosome Study of Animals. **Stain Technology**, v. 27, n. 1, p. 1–7, jan. 1952.

MAKINO, S. Human chromossomes. **Igaku Shoin, North-Holland publishing company**, v.8, Tokyo, Amsterdam, Oxford, p.600, 1975.

MALCOLM, S.; BARTON, P.; MURPHY, C.; FERGUSON-SMITH, M. A. Chromosomal Localization of a Single Copy Gene by in Situ Hybridization--Human Beta Globin Genes on the Short Arm of Chromosome 11. **Annals of Human Genetics**, v. 45, n. Pt 2, p. 135–141, maio 1981.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J.-B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.;

WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, 31 jul. 2005.

HARBOUR, C.; MAULIK, H. **History of Intellectual Disability**JH Stone, M Blouin, , 2010.Disponívelem:http://cirrie.buffalo.edu/encyclopedia/article.php?id=143&languag e=en.

MCCLELLAN, J.; KING, M.-C. Genetic Heterogeneity in Human Disease. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 210–217, abr. 2010.

MCKERNAN, K.; BLANCHARD, A.; KOTLER, L.; COSTA, G. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing. **US patent application** 20080003571, 2006.

MEFFORD, H. C.; CLAUIN, S.; SHARP, A. J.; MOLLER, R. S.; ULLMANN, R.; KAPUR, R.; PINKEL, D.; COOPER, G. M.; VENTURA, M.; ROPERS, H. H.; TOMMERUP, N.; EICHLER, E. E.; BELLANNE-CHANTELOT, C. Recurrent Reciprocal Genomic Rearrangements of 17q12 Are Associated with Renal Disease, Diabetes, and Epilepsy. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 5, p. 1057–1069, nov. 2007.

MIHCI, E.; GUNEY, K.; VELIPASAOGLU, S. DOOR (Deafness, Onychodystrophy, Osteodystrophy, Mental Retardation) Syndrome in One of the Twins after Conception with Intracytoplasmic Sperm Injection. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 146A, n. 11, p. 1483–1485, 1 jun. 2008.

MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L. G.; BROTHMAN, A. R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D. M.; CROLLA, J. A.; EICHLER, E. E.; EPSTEIN, C. J.; FAUCETT, W. A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J. M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E. B.; KOK, K.; KRANTZ, I. D.; KUHN, R. M.; LEE, C.; OSTELL, J. M.; ROSENBERG, C.; SCHERER, S. W.; SPINNER, N. B.; STAVROPOULOS, D. J.; TEPPERBERG, J. H.; THORLAND, E. C.; VERMEESCH, J. R.; WAGGONER, D. J.; WATSON, M. S.; MARTIN, C. L.; LEDBETTER, D. H. Consensus Statement: Chromosomal Micro*array* Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749–764, maio 2010.

MIR, A.; KAUFMAN, L.; NOOR, A.; MOTAZACKER, M. M.; JAMIL, T.; AZAM, M.; KAHRIZI, K.; RAFIQ, M. A.; WEKSBERG, R.; NASR, T.; NAEEM, F.; TZSCHACH, A.; KUSS, A. W.; ISHAK, G. E.; DOHERTY, D.; ROPERS, H. H.; BARKOVICH, A. J.; NAJMABADI, H.; AYUB, M.; VINCENT, J. B. Identification of Mutations in TRAPPC9, Which Encodes the NIK- and IKK-Beta-Binding Protein, in Nonsyndromic Autosomal-Recessive Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 6, p. 909–915, dez. 2009.

MOESCHLER, J. B.; SHEVELL, M.; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON GENETICS. Clinical Genetic Evaluation of the Child with Mental Retardation or Developmental Delays. **Pediatrics**, v. 117, n. 6, p. 2304–2316, jun. 2006.

MOLINARI, F.; FOULQUIER, F.; TARPEY, P. S.; MORELLE, W.; BOISSEL, S.; TEAGUE, J.; EDKINS, S.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R.; TURNER, G.; MATTHIJS, G.; GECZ, J.; MUNNICH, A.; COLLEAUX, L. Oligosaccharyltransferase-

Subunit Mutations in Nonsyndromic Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 5, p. 1150–1157, maio 2008.

MOLINARI, F.; RIO, M.; MESKENAITE, V.; ENCHA-RAZAVI, F.; AUGÉ, J.; BACQ, D.; BRIAULT, S.; VEKEMANS, M.; MUNNICH, A.; ATTIÉ-BITACH, T.; SONDEREGGER, P.; COLLEAUX, L. Truncating Neurotrypsin Mutation in Autosomal Recessive Nonsyndromic Mental Retardation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5599, p. 1779–1781, 29 nov. 2002.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P.; MELLMAN, W.; BATTIPS, D.; HUNGERFORD, D. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MOTAZACKER, M. M.; ROST, B. R.; HUCHO, T.; GARSHASBI, M.; KAHRIZI, K.; ULLMANN, R.; ABEDINI, S. S.; NIEH, S. E.; AMINI, S. H.; GOSWAMI, C.; TZSCHACH, A.; JENSEN, L. R.; SCHMITZ, D.; ROPERS, H. H.; NAJMABADI, H.; KUSS, A. W. A Defect in the lonotropic Glutamate Receptor 6 Gene (GRIK2) Is Associated with Autosomal Recessive Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 792–798, out. 2007.

MULLER, D.; KLOPOCKI, E.; NEUMANN, L. M.; MUNDLOS, S.; TAUPITZ, M.; SCHULZE, I.; ROPERS, H.-H.; QUERFELD, U.; ULLMANN, R. A Complex Phenotype with Cystic Renal Disease. **Kidney International**, v. 70, n. 9, p. 1656–1660, nov. 2006.

MUSANTE, L.; ROPERS, H. H. Genetics of Recessive Cognitive Disorders. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 1, p. 32–39, jan. 2014.

NAJMABADI, H.; MOTAZACKER, M. M.; GARSHASBI, M.; KAHRIZI, K.; TZSCHACH, A.; CHEN, W.; BEHJATI, F.; HADAVI, V.; NIEH, S. E.; ABEDINI, S. S.; VAZIFEHMAND, R.; FIROUZABADI, S. G.; JAMALI, P.; FALAH, M.; SEIFATI, S. M.; GRÜTERS, A.; LENZNER, S.; JENSEN, L. R.; RÜSCHENDORF, F.; KUSS, A. W.; ROPERS, H. H. Homozygosity Mapping in Consanguineous Families Reveals Extreme Heterogeneity of Non-Syndromic Autosomal Recessive Mental Retardation and Identifies 8 Novel Gene Loci. **Human Genetics**, v. 121, n. 1, p. 43–48, mar. 2007.

NEED, A. C.; SHASHI, V.; HITOMI, Y.; SCHOCH, K.; SHIANNA, K. V.; MCDONALD, M. T.; MEISLER, M. H.; GOLDSTEIN, D. B. Clinical Application of Exome Sequencing in Undiagnosed Genetic Conditions. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 6, p. 353–361, jun. 2012.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. **Genome Research**, v. 11, n. 5, p. 863–874, 1 maio 2001.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. Accounting for Human Polymorphisms Predicted to Affect Protein Function. **Genome Research**, v. 12, n. 3, p. 436–446, mar. 2002.

NG, S. B.; TURNER, E. H.; ROBERTSON, P. D.; FLYGARE, S. D.; BIGHAM, A. W.; LEE, C.; SHAFFER, T.; WONG, M.; BHATTACHARJEE, A.; EICHLER, E. E.; BAMSHAD, M.; NICKERSON, D. A.; SHENDURE, J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 272–276, 10 set. 2009.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD D. A. A minute chromosome in human chronic myelocytic leukaemia. **Science**, v. 132, p.1494, 1960.

ORRICO, A.; LAM, C.; GALLI, L.; DOTTI, M. T.; HAYEK, G.; TONG, S. F.; POON, P. M.; ZAPPELLA, M.; FEDERICO, A.; SORRENTINO, V. MECP2 Mutation in Male Patients with Non-Specific X-Linked Mental Retardation. **FEBS letters**, v. 481, n. 3, p. 285–288, 22 set. 2000.

PAINTER, T. S. THE Y-CHROMOSOME IN MAMMALS. **Science**, v. 53, n. 1378, p. 503–504, 27 maio 1921.

PAK, C.; GARSHASBI, M.; KAHRIZI, K.; GROSS, C.; APPONI, L. H.; NOTO, J. J.; KELLY, S. M.; LEUNG, S. W.; TZSCHACH, A.; BEHJATI, F.; ABEDINI, S. S.; MOHSENI, M.; JENSEN, L. R.; HU, H.; HUANG, B.; STAHLEY, S. N.; LIU, G.; WILLIAMS, K. R.; BURDICK, S.; FENG, Y.; SANYAL, S.; BASSELL, G. J.; ROPERS, H.-H.; NAJMABADI, H.; CORBETT, A. H.; MOBERG, K. H.; KUSS, A. W. Mutation of the Conserved Polyadenosine RNA Binding Protein, ZC3H14/dNab2, Impairs Neural Function in Drosophila and Humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 30, p. 12390–12395, 26 jul. 2011.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. Science (New York, N.Y.), v. 168, n. 3937, p. 1356–1358, 12 jun. 1970.

PATAU, K.; SMITH, D. W.; THERMAN, E.; INHORN, S. L.; WAGNER, H. P. Multiple Congenital Anomaly Caused by an Extra Autosome. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7128, p. 790–793, 9 abr. 1960.

PENROSE, L. S. A Clinical and Genetic Study of 1,280 Cases of Mental Defect. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine, v. 56, n. 3, p. 713, 1 set. 1938.

PERKEL, J. Making Contact with Sequencing's Fourth Generation. **BioTechniques**, v. 50, n. 2, p. 93–95, fev. 2011.

PERRY, J.; FEATHER, S.; SMITH, A.; PALMER, S.; ASHWORTH, A. The Human FXY Gene Is Located within Xp22.3: Implications for Evolution of the Mammalian X Chromosome. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 2, p. 299–305, fev. 1998.

PHILIPS, A. K.; SIRÉN, A.; AVELA, K.; SOMER, M.; PEIPPO, M.; AHVENAINEN, M.; DOAGU, F.; ARVIO, M.; KÄÄRIÄINEN, H.; VAN ESCH, H.; FROYEN, G.; HAAS, S. A.; HU, H.; KALSCHEUER, V. M.; JÄRVELÄ, I. X-Exome Sequencing in Finnish Families with Intellectual Disability - Four Novel Mutations and Two Novel Syndromic Phenotypes. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 9, n. 1, p. 49, 2014.

PINKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; COLLINS, C.; KUO, W. L.; CHEN, C.; ZHAI, Y.; DAIRKEE, S. H.; LJUNG, B. M.; GRAY, J. W.; ALBERTSON, D. G. High Resolution Analysis of DNA Copy Number Variation Using Comparative Genomic Hybridization to Micro*array*s. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 207–211, out. 1998.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-Sensitivity, Fluorescence Hybridization. **Proceedings of the National Academy** of Sciences of the United States of America, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, maio 1986.

PINSON, L. Embryonic Expression of the Human MID1 Gene and Its Mutations in Opitz Syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 5, p. 381–386, 1 maio 2004.

PITON, A.; REDIN, C.; MANDEL, J.-L. XLID-Causing Mutations and Associated Genes Challenged in Light of Data From Large-Scale Human Exome Sequencing. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 2, p. 368–383, ago. 2013.

PORTES, V. des; BODDAERT, N.; SACCO, S.; BRIAULT, S.; MAINCENT, K.; BAHI, N.; GOMOT, M.; RONCE, N.; BURSZTYN, J.; ADAMSBAUM, C.; ZILBOVICIUS, M.; CHELLY, J.; MORAINE, C. Specific Clinical and Brain MRI Features in Mentally Retarded Patients with Mutations in theOligophrenin-1 Gene. **American Journal of Medical Genetics**, v. 124A, n. 4, p. 364–371, 1 fev. 2004.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.-M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; ANTOLIN, M.; ARTIGUENAVE, F.; BLOTTIERE, H.; BORRUEL, N.; BRULS, T.; CASELLAS, F.; CHERVAUX, C.; CULTRONE, A.; DELORME, C.; DENARIAZ, G.; DERVYN, R.; FORTE, M.; FRISS, C.; VAN DE GUCHTE, M.; GUEDON, E.; HAIMET, F.; JAMET, A.; JUSTE, C.; KACI, G.; KLEEREBEZEM, M.; KNOL, J.; KRISTENSEN, M.; LAYEC, S.; LE ROUX, K.; LECLERC, M.; MAGUIN, E.; MELO MINARDI, R.; OOZEER, R.; RESCIGNO, M.; SANCHEZ, N.; TIMS, S.; TORREJON, T.; VARELA, E.; DE VOS, W.; WINOGRADSKY, Y .: ZOETENDAL, E .: BORK, P .: EHRLICH, S. D .: WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, v. 464, n. 7285, p. 59–65, 4 mar. 2010.

RAUCH, A.; HOYER, J.; GUTH, S.; ZWEIER, C.; KRAUS, C.; BECKER, C.; ZENKER, M.; HÜFFMEIER, U.; THIEL, C.; RÜSCHENDORF, F.; NÜRNBERG, P.; REIS, A.; TRAUTMANN, U. Diagnostic Yield of Various Genetic Approaches in Patients with Unexplained Developmental Delay or Mental Retardation. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140A, n. 19, p. 2063–2074, 1 out. 2006.

RAUCH, A.; WIECZOREK, D.; GRAF, E.; WIELAND, T.; ENDELE, S.; SCHWARZMAYR, T.; ALBRECHT, B.; BARTHOLDI, D.; BEYGO, J.; DI DONATO, N.; DUFKE, A.; CREMER, K.; HEMPEL, M.; HORN, D.; HOYER, J.; JOSET, P.; RÖPKE, A.; MOOG, U.; RIESS, A.; THIEL, C. T.; TZSCHACH, A.; WIESENER, A.; WOHLLEBER, E.; ZWEIER, C.; EKICI, A. B.; ZINK, A. M.; RUMP, A.; MEISINGER, C.; GRALLERT, H.; STICHT, H.; SCHENCK, A.; ENGELS, H.; RAPPOLD, G.; SCHRÖCK, E.; WIEACKER, P.; RIESS, O.; MEITINGER, T.; REIS, A.; STROM, T. M. Range of Genetic Mutations Associated with Severe Non-Syndromic Sporadic Intellectual Disability: An Exome Sequencing Study. **The Lancet**, v. 380, n. 9854, p. 1674–1682, nov. 2012.

RAVNAN, J. B. Subtelomere FISH Analysis of 11 688 Cases: An Evaluation of the Frequency and Pattern of Subtelomere Rearrangements in Individuals with Developmental Disabilities. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 6, p. 478–489, 1 jun. 2006.

REAMON-BUETTNER, S. M.; CHO, S.-H.; BORLAK, J. Mutations in the 3'untranslated Region of GATA4 as Molecular Hotspots for Congenital Heart Disease (CHD). **BMC medical genetics**, v. 8, p. 38, 25 jun. 2007.

RIEGEL, M. Human Molecular Cytogenetics: From Cells to Nucleotides. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 Suppl, p. 194–209, mar. 2014.

ROCHE 454 SEQUENCING. **System features for GS FLX titanium series**, 24 nov. 2008, disponível em: http://www.454.com/products-solutions/system-features.asp.

ROBINSON, P. N. Whole-Exome Sequencing for Finding de Novo Mutations in Sporadic Mental Retardation. **Genome Biology**, v. 11, n. 12, p. 144, 2010.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, v. 11, n. 1, p. 3–11, jan. 2001.

ROPERS, H. H. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 11, p. 161–187, 2010.

ROPERS, H.-H.; HAMEL, B. C. J. X-linked mental retardation. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 1, p. 46–57, jan. 2005.

ROPERS, H.-H.; HOELTZENBEIN, M.; KALSCHEUER, V.; YNTEMA, H.; HAMEL, B.; FRYNS, J.-P.; CHELLY, J.; PARTINGTON, M.; GECZ, J.; MORAINE, C. Nonsyndromic X-Linked Mental Retardation: Where Are the Missing Mutations? **Trends in Genetics**, v. 19, n. 6, p. 316–320, jun. 2003.

ROSENBERG, C.; KNIJNENBURG, J.; BAKKER, E.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; SLOOS, W.; OTTO, P. A.; KRIEK, M.; HANSSON, K.; KREPISCHI-SANTOS, A. C. V.; FIEGLER, H.; CARTER, N. P.; BIJLSMA, E. K.; VAN HAERINGEN, A.; SZUHAI, K.; TANKE, H. J. *Array*-CGH Detection of Micro Rearrangements in Mentally Retarded Individuals: Clinical Significance of Imbalances Present Both in Affected Children and Normal Parents. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 2, p. 180–186, fev. 2006.

RUSK, N. Torrents of sequence. Nature Methods, v. 8, n. 1, p. 44–44, jan. 2011.

SCHALOCK, R. L.; BORTHWICK-DUFFY, S.A.; BRADLEY, V. J; BUNTINX, W.H.E; COULTER, D. L; CRAIG, E. M; GOMEZ, S.C.; LACHAPELLE, Y.; LUCKASSON, R.; REEVE, A.; SHOGREN, K. A.; SNELL, M.E.; SPREAT, S.; TASSE, M. J.; THOMPSON, J.R.; VERDUGO-ALONSO, M. A.; WEHMEYER, M. L.; YEAGER, M. H. Intellectual disability: definition, classification, and systems of supports. 11. Ed, 2010

SCHUURS-HOEIJMAKERS, J. H. M.; GERAGHTY, M. T.; KAMSTEEG, E.-J.; BEN-SALEM, S.; DE BOT, S. T.; NIJHOF, B.; VAN DE VONDERVOORT, I. I. G. M.; VAN DER GRAAF, M.; NOBAU, A. C.; OTTE-HÖLLER, I.; VERMEER, S.; SMITH, A. C.; HUMPHREYS, P.; SCHWARTZENTRUBER, J.; ALI, B. R.; AL-YAHYAEE, S. A.; TARIQ, S.; PRAMATHAN, T.; BAYOUMI, R.; KREMER, H. P. H.; VAN DE WARRENBURG, B. P.; VAN DEN AKKER, W. M. R.; GILISSEN, C.; VELTMAN, J. A.; JANSSEN, I. M.; VULTO-VAN SILFHOUT, A. T.; VAN DER VELDE-VISSER, S.; LEFEBER, D. J.; DIEKSTRA, A.; ERASMUS, C. E.; WILLEMSEN, M. A.; VISSERS, L. E. L. M.; LAMMENS, M.; VAN BOKHOVEN, H.; BRUNNER, H. G.; WEVERS, R. A.; SCHENCK, A.; AL-GAZALI, L.; DE VRIES, B. B. A.; DE BROUWER, A. P. M. Mutations in DDHD2, Encoding an Intracellular Phospholipase A1, Cause a Recessive Form of Complex Hereditary Spastic Paraplegia. **The American Journal** of Human Genetics, v. 91, n. 6, p. 1073–1081, dez. 2012.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, v. 2, p. 971-972, 1971.

SEIFERT, W.; HOLDER-ESPINASSE, M.; SPRANGER, S.; HOELTZENBEIN, M.; ROSSIER, E.; DOLLFUS, H.; LACOMBE, D.; VERLOES, A.; CHRZANOWSKA, K. H.; MAEGAWA, G. H. B.; CHITAYAT, D.; KOTZOT, D.; HUHLE, D.; MEINECKE, P.; ALBRECHT, B.; MATHIJSSEN, I.; LEHEUP, B.; RAILE, K.; HENNIES, H. C.; HORN, D. Mutational Spectrum of COH1 and Clinical Heterogeneity in Cohen Syndrome. Journal of Medical Genetics, v. 43, n. 5, p. e22, maio 2006.

SEVEN, M.; OZKILIÇ, A.; YÜKSEL, A. Dysmorphic Face in Two Siblings with Infantile Neuroaxonal Dystrophy. **Genetic Counseling (Geneva, Switzerland)**, v. 13, n. 4, p. 465–473, 2002.

SHARMA, D.; JANKOWSKY, E. The Ded1/DDX3 Subfamily of DEAD-Box RNA Helicases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 4, p. 343–360, jul. 2014.

SHARP, A. J.; HANSEN, S.; SELZER, R. R.; CHENG, Z.; REGAN, R.; HURST, J. A.; STEWART, H.; PRICE, S. M.; BLAIR, E.; HENNEKAM, R. C.; FITZPATRICK, C. A.; SEGRAVES, R.; RICHMOND, T. A.; GUIVER, C.; ALBERTSON, D. G.; PINKEL, D.; EIS, P. S.; SCHWARTZ, S.; KNIGHT, S. J. L.; EICHLER, E. E. Discovery of Previously Unidentified Genomic Disorders from the Duplication Architecture of the Human Genome. **Nature Genetics**, v. 38, n. 9, p. 1038–1042, set. 2006.

SHASHI, V.; MCCONKIE-ROSELL, A.; ROSELL, B.; SCHOCH, K.; VELLORE, K.; MCDONALD, M.; JIANG, Y.-H.; XIE, P.; NEED, A.; GOLDSTEIN, D. B.; GOLDSTEIN, D. G. The Utility of the Traditional Medical Genetics Diagnostic Evaluation in the Context of next-Generation Sequencing for Undiagnosed Genetic Disorders. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 16, n. 2, p. 176–182, fev. 2014.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, out. 2008.

SHENDURE, J.; MITRA, R. D.; VARMA, C.; CHURCH, G. M. Advanced sequencing technologies: methods and goals. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 5, p. 335–344, maio 2004.

SHIGEMIZU, D.; MOMOZAWA, Y.; ABE, T.; MORIZONO, T.; BOROEVICH, K. A.; TAKATA, S.; ASHIKAWA, K.; KUBO, M.; TSUNODA, T. Performance comparison of four commercial human whole-exome capture platforms. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12742, 3 ago. 2015.

SHINAWI, M.; LIU, P.; KANG, S.-H. L.; SHEN, J.; BELMONT, J. W.; SCOTT, D. A.; PROBST, F. J.; CRAIGEN, W. J.; GRAHAM, B. H.; PURSLEY, A.; CLARK, G.; LEE, J.; PROUD, M.; STOCCO, A.; RODRIGUEZ, D. L.; KOZEL, B. A.; SPARAGANA, S.; ROEDER, E. R.; MCGREW, S. G.; KURCZYNSKI, T. W.; ALLISON, L. J.; AMATO, S.; SAVAGE, S.; PATEL, A.; STANKIEWICZ, P.; BEAUDET, A. L.; CHEUNG, S. W.; LUPSKI, J. R. Recurrent Reciprocal 16p11.2 Rearrangements Associated with Global

Developmental Delay, Behavioural Problems, Dysmorphism, Epilepsy, and Abnormal Head Size. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 5, p. 332–341, maio 2010.

SHOICHET, S. A.; HOFFMANN, K.; MENZEL, C.; TRAUTMANN, U.; MOSER, B.; HOELTZENBEIN, M.; ECHENNE, B.; PARTINGTON, M.; VAN BOKHOVEN, H.; MORAINE, C.; FRYNS, J.-P.; CHELLY, J.; ROTT, H.-D.; ROPERS, H.-H.; KALSCHEUER, V. M. Mutations in the ZNF41 Gene Are Associated with Cognitive Deficits: Identification of a New Candidate for X-Linked Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 6, p. 1341–1354, dez. 2003.

SHOICHET, S. A.; KUNDE, S.-A.; VIERTEL, P.; SCHELL-APACIK, C.; VON VOSS, H.; TOMMERUP, N.; ROPERS, H.-H.; KALSCHEUER, V. M. Haploinsufficiency of Novel FOXG1B Variants in a Patient with Severe Mental Retardation, Brain Malformations and Microcephaly. **Human Genetics**, v. 117, n. 6, p. 536–544, out. 2005.

SIFRIM, A.; HITZ, M.-P.; WILSDON, A.; BRECKPOT, J.; TURKI, S. H. A.; THIENPONT, B.; MCRAE, J.; FITZGERALD, T. W.; SINGH, T.; SWAMINATHAN, G. J.; PRIGMORE, E.; RAJAN, D.; ABDUL-KHALIQ, H.; BANKA, S.; BAUER, U. M. M.; BENTHAM, J.; BERGER, F.; BHATTACHARYA, S.; BU'LOCK, F.; CANHAM, N.; COLGIU, I.-G.; COSGROVE, C.; COX, H.; DAEHNERT, I.; DALY, A.; DANESH, J.; FRYER, A.; GEWILLIG, M.; HOBSON, E.; HOFF, K.; HOMFRAY, T.; KAHLERT, A.-K.: KETLEY, A.: KRAMER, H.-H.: LACHLAN, K.: LAMPE, A. K.: LOUW, J. J.: MANICKARA, A. K.; MANASE, D.; MCCARTHY, K. P.; METCALFE, K.; MOORE, C.; NEWBURY-ECOB, R.; OMER, S. O.; OUWEHAND, W. H.; PARK, S.-M.; PARKER, M. J.; PICKARDT, T.; POLLARD, M. O.; ROBERT, L.; ROBERTS, D. J.; SAMBROOK, J.; SETCHFIELD, K.; STILLER, B.; THORNBOROUGH, C.; TOKA, O.; WATKINS, H.; WILLIAMS, D.; WRIGHT, M.; MITAL, S.; DAUBENEY, P. E. F.; KEAVNEY, B.; GOODSHIP, J.; ABU-SULAIMAN, R. M.; KLAASSEN, S.; WRIGHT, C. F.; FIRTH, H. V.; BARRETT, J. C.; DEVRIENDT, K.; FITZPATRICK, D. R.; BROOK, J. D.; HURLES, M. E. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. Nature Genetics, v. 48, n. 9, p. 1060-1065, 1 ago. 2016.

SILVERMAN, W. Prevention of Intellectual and Developmental Disabilities. **Intellectual and Developmental Disabilities**, v. 47, n. 4, p. 320–322, ago. 2009.

SNIJDERS, A. M.; NOWAK, N.; SEGRAVES, R.; BLACKWOOD, S.; BROWN, N.; CONROY, J.; HAMILTON, G.; HINDLE, A. K.; HUEY, B.; KIMURA, K.; LAW, S.; MYAMBO, K.; PALMER, J.; YLSTRA, B.; YUE, J. P.; GRAY, J. W.; JAIN, A. N.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D. G. Assembly of Micro*array*s for Genome-Wide Measurement of DNA Copy Number. **Nature Genetics**, v. 29, n. 3, p. 263–264, nov. 2001.

SNIJDERS BLOK, L.; MADSEN, E.; JUUSOLA, J.; GILISSEN, C.; BARALLE, D.; REIJNDERS, M. R. F.; VENSELAAR, H.; HELSMOORTEL, C.; CHO, M. T.; HOISCHEN, A.; VISSERS, L. E. L. M.; KOEMANS, T. S.; WISSINK-LINDHOUT, W.; EICHLER, E. E.; ROMANO, C.; VAN ESCH, H.; STUMPEL, C.; VREEBURG, M.; SMEETS, E.; OBERNDORFF, K.; VAN BON, B. W. M.; SHAW, M.; GECZ, J.; HAAN, E.; BIENEK, M.; JENSEN, C.; LOEYS, B. L.; VAN DIJCK, A.; INNES, A. M.; RACHER, H.; VERMEER, S.; DI DONATO, N.; RUMP, A.; TATTON-BROWN, K.; PARKER, M. J.; HENDERSON, A.; LYNCH, S. A.; FRYER, A.; ROSS, A.; VASUDEVAN, P.; KINI, U.; NEWBURY-ECOB, R.; CHANDLER, K.; MALE, A.; DIJKSTRA, S.; SCHIEVING, J.; GILTAY, J.; VAN GASSEN, K. L. I.; SCHUURS-HOEIJMAKERS, J.; TAN, P. L.; PEDIADITAKIS, I.; HAAS, S. A.; RETTERER, K.; REED, P.; MONAGHAN, K. G.; HAVERFIELD, E.; NATOWICZ, M.; MYERS, A.; KRUER, M. C.; STEIN, Q.; STRAUSS, K. A.; BRIGATTI, K. W.; KEATING, K.; BURTON, B. K.; KIM, K. H.; CHARROW, J.; NORMAN, J.; FOSTER-BARBER, A.; KLINE, A. D.; KIMBALL, A.; ZACKAI, E.; HARR, M.; FOX, J.; MCLAUGHLIN, J.; LINDSTROM, K.; HAUDE, K. M.; VAN ROOZENDAAL, K.; BRUNNER, H.; CHUNG, W. K.; KOOY, R. F.; PFUNDT, R.; KALSCHEUER, V.; MEHTA, S. G.; KATSANIS, N.; KLEEFSTRA, T. Mutations in DDX3X Are a Common Cause of Unexplained Intellectual Disability with Gender-Specific Effects on Wnt Signaling. **The American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 2, p. 343–352, ago. 2015.

SO, J.; SUCKOW, V.; KIJAS, Z.; KALSCHEUER, V.; MOSER, B.; WINTER, J.; BAARS, M.; FIRTH, H.; LUNT, P.; HAMEL, B.; MEINECKE, P.; MORAINE, C.; ODENT, S.; SCHINZEL, A.; VAN DER SMAGT, J. J.; DEVRIENDT, K.; ALBRECHT, B.; GILLESSEN-KAESBACH, G.; VAN DER BURGT, I.; PETRIJ, F.; FAIVRE, L.; MCGAUGHRAN, J.; MCKENZIE, F.; OPITZ, J. M.; COX, T.; SCHWEIGER, S. Mild Phenotypes in a Series of Patients with Opitz GBBB Syndrome with MID1 Mutations. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 132A, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2005.

SOLINAS-TOLDO, S.; LAMPEL, S.; STILGENBAUER, S.; NICKOLENKO, J.; BENNER, A.; DÖHNER, H.; CREMER, T.; LICHTER, P. Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 20, n. 4, p. 399–407, dez. 1997.

SPRANGER, J.; HALL, B. D.; HANE, B.; SRIVASTAVA, A.; STEVENSON, R. E. Spectrum of Schwartz-Jampel Syndrome Includes Micromelic Chondrodysplasia, Kyphomelic Dysplasia, and Burton Disease. **American Journal of Medical Genetics**, v. 94, n. 4, p. 287–295, 2 out. 2000.

STONE, E. A.; SIDOW, A. Physicochemical Constraint Violation by Missense Substitutions Mediates Impairment of Protein Function and Disease Severity. **Genome Research**, v. 15, n. 7, p. 978–986, 17 jun. 2005.

TARPEY, P.; PARNAU, J.; BLOW, M.; WOFFENDIN, H.; BIGNELL, G.; COX, C.; COX, J.; DAVIES, H.; EDKINS, S.; HOLDEN, S.; KORNY, A.; MALLYA, U.; MOON, J.; O'MEARA, S.; PARKER, A.; STEPHENS, P.; STEVENS, C.; TEAGUE, J.; DONNELLY, A.; MANGELSDORF, M.; MULLEY, J.; PARTINGTON, M.; TURNER, G.; STEVENSON, R.; SCHWARTZ, C.; YOUNG, I.; EASTON, D.; BOBROW, M.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R.; GECZ, J.; WOOSTER, R.; RAYMOND, F. L. Mutations in the DLG3 Gene Cause Nonsyndromic X-Linked Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 2, p. 318–324, ago. 2004.

TARPEY, P. S.; RAYMOND, F. L.; NGUYEN, L. S.; RODRIGUEZ, J.; HACKETT, A.; VANDELEUR, L.; SMITH, R.; SHOUBRIDGE, C.; EDKINS, S.; STEVENS, C.; O'MEARA, S.; TOFTS, C.; BARTHORPE, S.; BUCK, G.; COLE, J.; HALLIDAY, K.; HILLS, K.; JONES, D.; MIRONENKO, T.; PERRY, J.; VARIAN, J.; WEST, S.; WIDAA, S.; TEAGUE, J.; DICKS, E.; BUTLER, A.; MENZIES, A.; RICHARDSON, D.; JENKINSON, A.; SHEPHERD, R.; RAINE, K.; MOON, J.; LUO, Y.; PARNAU, J.; BHAT, S. S.; GARDNER, A.; CORBETT, M.; BROOKS, D.; THOMAS, P.; PARKINSON-LAWRENCE, E.; PORTEOUS, M. E.; WARNER, J. P.; SANDERSON,

T.; PEARSON, P.; SIMENSEN, R. J.; SKINNER, C.; HOGANSON, G.; SUPERNEAU, D.; WOOSTER, R.; BOBROW, M.; TURNER, G.; STEVENSON, R. E.; SCHWARTZ, C. E.; FUTREAL, P. A.; SRIVASTAVA, A. K.; STRATTON, M. R.; GÉCZ, J. Mutations in UPF3B, a Member of the Nonsense-Mediated mRNA Decay Complex, Cause Syndromic and Nonsyndromic Mental Retardation. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1127–1133, set. 2007.

TARPEY, P. S.; SMITH, R.; PLEASANCE, E.; WHIBLEY, A.; EDKINS, S.; HARDY, C.; O'MEARA, S.; LATIMER, C.; DICKS, E.; MENZIES, A.; STEPHENS, P.; BLOW, M.; GREENMAN, C.; XUE, Y.; TYLER-SMITH, C.; THOMPSON, D.; GRAY, K.; ANDREWS, J.; BARTHORPE, S.; BUCK, G.; COLE, J.; DUNMORE, R.; JONES, D.; MADDISON, M.; MIRONENKO, T.; TURNER, R.; TURRELL, K.; VARIAN, J.; WEST. S.; WIDAA, S.; WRAY, P.; TEAGUE, J.; BUTLER, A.; JENKINSON, A.; JIA, M.; RICHARDSON, D.; SHEPHERD, R.; WOOSTER, R.; TEJADA, M. I.; MARTINEZ, F.; CARVILL, G.; GOLIATH, R.; DE BROUWER, A. P. M.; VAN BOKHOVEN, H.; VAN ESCH, H.; CHELLY, J.; RAYNAUD, M.; ROPERS, H.-H.; ABIDI, F. E.; SRIVASTAVA, A. K.; COX, J.; LUO, Y.; MALLYA, U.; MOON, J.; PARNAU, J.; MOHAMMED, S.; TOLMIE, J. L.; SHOUBRIDGE, C.; CORBETT, M.; GARDNER, A.; HAAN, E.; RUJIRABANJERD, S.; SHAW, M.; VANDELEUR, L.; FULLSTON, T.; EASTON, D. F.; BOYLE, J.; PARTINGTON, M.; HACKETT, A.; FIELD, M.; SKINNER, C.; STEVENSON, R. E.; BOBROW, M.; TURNER, G.; SCHWARTZ, C. E.; GECZ, J.; RAYMOND, F. L.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R. A Systematic, Large-Scale Resequencing Screen of X-Chromosome Coding Exons in Mental Retardation. Nature Genetics, v. 41, n. 5, p. 535–543, maio 2009.

TATTON-BROWN, K.; DOUGLAS, J.; COLEMAN, K.; BAUJAT, G.; COLE, T. R. P.; DAS, S.; HORN, D.; HUGHES, H. E.; TEMPLE, I. K.; FARAVELLI, F.; WAGGONER, D.; TURKMEN, S.; CORMIER-DAIRE, V.; IRRTHUM, A.; RAHMAN, N.; CHILDHOOD OVERGROWTH COLLABORATION. Genotype-Phenotype Associations in Sotos Syndrome: An Analysis of 266 Individuals with NSD1 Aberrations. **American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 2, p. 193–204, ago. 2005.

TISO, N.; STEPHAN, D. A.; NAVA, A.; BAGATTIN, A.; DEVANEY, J. M.; STANCHI, F.; LARDERET, G.; BRAHMBHATT, B.; BROWN, K.; BAUCE, B.; MURIAGO, M.; BASSO, C.; THIENE, G.; DANIELI, G. A.; RAMPAZZO, A. Identification of Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene in Families Affected with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 2 (ARVD2). **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 3, p. 189–194, 1 fev. 2001.

TJIO, J. H.; LEVAN, A. THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN. **Hereditas**, v. 42, n. 1–2, p. 1–6, 9 jul. 1956.

TOPPER, S.; OBER, C.; DAS, S. Exome Sequencing and the Genetics of Intellectual Disability. **Clinical Genetics**, v. 80, n. 2, p. 117–126, ago. 2011.

TRAPNELL, C.; SALZBERG, S. L. How to map billions of short reads onto genomes. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 455–457, maio 2009.

UHER, R. The role of genetic variation in the causation of mental illness: an evolutioninformed framework. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 12, p. 1072–1082, dez. 2009.

VAN BOKHOVEN, H. Genetic and Epigenetic Networks in Intellectual Disabilities. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 81–104, 15 dez. 2011.

VAN BON, B. W. M.; MEFFORD, H. C.; MENTEN, B.; KOOLEN, D. A.; SHARP, A. J.; NILLESEN, W. M.; INNIS, J. W.; DE RAVEL, T. J. L.; MERCER, C. L.; FICHERA, M.; STEWART, H.; CONNELL, L. E.; OUNAP, K.; LACHLAN, K.; CASTLE, B.; VAN DER AA, N.; VAN RAVENSWAAIJ, C.; NOBREGA, M. A.; SERRA-JUHÉ, C.; SIMONIC, I.; DE LEEUW, N.; PFUNDT, R.; BONGERS, E. M.; BAKER, C.; FINNEMORE, P.; HUANG, S.; MALONEY, V. K.; CROLLA, J. A.; VAN KALMTHOUT, M.; ELIA, M.; VANDEWEYER, G.; FRYNS, J. P.; JANSSENS, S.; FOULDS, N.; REITANO, S.; SMITH, K.; PARKEL, S.; LOEYS, B.; WOODS, C. G.; OOSTRA, A.; SPELEMAN, F.; PEREIRA, A. C.; KURG, A.; WILLATT, L.; KNIGHT, S. J. L.; VERMEESCH, J. R.; ROMANO, C.; BARBER, J. C.; MORTIER, G.; PÉREZ-JURADO, L. A.; KOOY, F.; BRUNNER, H. G.; EICHLER, E. E.; KLEEFSTRA, T.; DE VRIES, B. B. A. Further Delineation of the 15q13 Microdeletion and Duplication Syndromes: A Clinical Spectrum Varying from Non-Pathogenic to a Severe Outcome. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 8, p. 511–523, ago. 2009.

VAN KARNEBEEK, C. D. M.; JANSWEIJER, M. C. E.; LEENDERS, A. G. E.; OFFRINGA, M.; HENNEKAM, R. C. M. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 1, p. 6–25, jan. 2005.

VAN TASSELL, C. P.; SMITH, T. P. L.; MATUKUMALLI, L. K.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; LAWLEY, C. T.; HAUDENSCHILD, C. D.; MOORE, S. S.; WARREN, W. C.; SONSTEGARD, T. S. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. **Nature Methods**, v. 5, n. 3, p. 247–252, mar. 2008.

VELTMAN, J. A.; BRUNNER, H. G. De novo mutations in human genetic disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 8, p. 565–575, 18 jul. 2012.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; 163 DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.: WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGÓ, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The Sequence of the Human Genome. Science (New York, N.Y.), v. 291, n. 5507, p. 1304–1351, 16 fev. 2001.

VISSERS, L. E. L. M.; DE LIGT, J.; GILISSEN, C.; JANSSEN, I.; STEEHOUWER, M.; DE VRIES, P.; VAN LIER, B.; ARTS, P.; WIESKAMP, N.; DEL ROSARIO, M.; VAN BON, B. W. M.; HOISCHEN, A.; DE VRIES, B. B. A.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A. A de novo paradigm for mental retardation. **Nature Genetics**, v. 42, n. 12, p. 1109–1112, dez. 2010.

VISSERS, L. E. L. M.; DE VRIES, B. B. A.; OSOEGAWA, K.; JANSSEN, I. M.; FEUTH, T.; CHOY, C. O.; STRAATMAN, H.; VAN DER VLIET, W.; HUYS, E. H. L. P. G.; VAN RIJK, A.; SMEETS, D.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. A.; KNOERS, N. V.; VAN DER BURGT, I.; DE JONG, P. J.; BRUNNER, H. G.; VAN KESSEL, A. G.; SCHOENMAKERS, E. F. P. M.; VELTMAN, J. A. *Array*-Based Comparative Genomic Hybridization for the Genomewide Detection of Submicroscopic Chromosomal Abnormalities. **The American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 6, p. 1261–1270, dez. 2003.

VISSERS, L. E. L. M.; GILISSEN, C.; VELTMAN, J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 9–18, 27 out. 2015.

VOLK, A.; CONBOY, E.; WICAL, B.; PATTERSON, M.; KIRMANI, S. Whole-Exome Sequencing in the Clinic: Lessons from Six Consecutive Cases from the Clinician's Perspective. **Molecular Syndromology**, v. 6, n. 1, p. 23–31, 3 fev. 2015.

SILFHOUT, V.; RAJAMANICKAM, A. T.; JENSIK, P. J.; VERGULT, S.; DE ROCKER, N.; NEWHALL, K. J.; RAGHAVAN, R.; REARDON, S. N.; JARRETT, K.; MCINTYRE, T.; BULINSKI, J.; OWNBY, S. L.; HUGGENVIK, J. I.; MCKNIGHT, G. S.; ROSE, G.

M.; CAI, X.; WILLAERT, A.; ZWEIER, C.; ENDELE, S.; DE LIGT, J.; VAN BON, B. W. M.; LUGTENBERG, D.; DE VRIES, P. F.; VELTMAN, J. A.; VAN BOKHOVEN, H.; BRUNNER, H. G.; RAUCH, A.; DE BROUWER, A. P. M.; CARVILL, G. L.; HOISCHEN, A.; MEFFORD, H. C.; EICHLER, E. E.; VISSERS, L. E. L. M.; MENTEN, B.; COLLARD, M. W.; DE VRIES, B. B. A. Mutations Affecting the SAND Domain of DEAF1 Cause Intellectual Disability with Severe Speech Impairment and Behavioral Problems. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 5, p. 649–661, 1 maio 2014.

WAGENSTALLER, J.; SPRANGER, S.; LORENZ-DEPIEREUX, B.; KAZMIERCZAK, B.; NATHRATH, M.; WAHL, D.; HEYE, B.; GLASER, D.; LIEBSCHER, V.; MEITINGER, T.; STROM, T. M. Copy-Number Variations Measured by Single-Nucleotide-Polymorphism Oligonucleotide *Array*s in Patients with Mental Retardation. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 768–779, out. 2007.

WALDEYER, W. Uber karyokinese und ihre Beziehungenzu den Befruchtungsvorgangen. Arch. Mikr. Anat., v.32, p. 1-122, 1888.

WHEELER, D. A.; SRINIVASAN, M.; EGHOLM, M.; SHEN, Y.; CHEN, L.; MCGUIRE, A.; HE, W.; CHEN, Y.-J.; MAKHIJANI, V.; ROTH, G. T.; GOMES, X.; TARTARO, K.; NIAZI, F.; TURCOTTE, C. L.; IRZYK, G. P.; LUPSKI, J. R.; CHINAULT, C.; SONG, X.; LIU, Y.; YUAN, Y.; NAZARETH, L.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; MARGULIES, M.; WEINSTOCK, G. M.; GIBBS, R. A.; ROTHBERG, J. M. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. **Nature**, v. 452, n. 7189, p. 872–876, 17 abr. 2008.

WILLATT, L.; COX, J.; BARBER, J.; CABANAS, E. D.; COLLINS, A.; DONNAI, D.; FITZPATRICK, D. R.; MAHER, E.; MARTIN, H.; PARNAU, J.; PINDAR, L.; RAMSAY, J.; SHAW-SMITH, C.; SISTERMANS, E. A.; TETTENBORN, M.; TRUMP, D.; DE VRIES, B. B. A.; WALKER, K.; RAYMOND, F. L. 3q29 Microdeletion Syndrome: Clinical and Molecular Characterization of a New Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 1, p. 154–160, jul. 2005.

WILLEMSEN, M. H.; VISSERS, L. E. L.; WILLEMSEN, M. A. A. P.; VAN BON, B. W. M.; KROES, T.; DE LIGT, J.; DE VRIES, B. B.; SCHOOTS, J.; LUGTENBERG, D.; HAMEL, B. C. J.; VAN BOKHOVEN, H.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A.; KLEEFSTRA, T. Mutations in *DYNC1H1* Cause Severe Intellectual Disability with Neuronal Migration Defects. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 3, p. 179–183, mar. 2012.

WINIWARTER, H. V. Études sur la spermatogenese humaine. Arch Biologie, v.27, 1912.

WRIGHT, C. F.; FITZGERALD, T. W.; JONES, W. D.; CLAYTON, S.; MCRAE, J. F.; VAN KOGELENBERG, M.; KING, D. A.; AMBRIDGE, K.; BARRETT, D. M.; BAYZETINOVA, T.; BEVAN, A. P.; BRAGIN, E.; CHATZIMICHALI, E. A.; GRIBBLE, S.; JONES, P.; KRISHNAPPA, N.; MASON, L. E.; MILLER, R.; MORLEY, K. I.; PARTHIBAN, V.; PRIGMORE, E.; RAJAN, D.; SIFRIM, A.; SWAMINATHAN, G. J.; TIVEY, A. R.; MIDDLETON, A.; PARKER, M.; CARTER, N. P.; BARRETT, J. C.; HURLES, M. E.; FITZPATRICK, D. R.; FIRTH, H. V.; DDD STUDY. Genetic Diagnosis of Developmental Disorders in the DDD Study: A Scalable Analysis of Genome-Wide Research Data. Lancet (London, England), v. 385, n. 9975, p. 1305–1314, 4 abr. 2015.

WU, Z.; GUI, S.; QUAN, Z.; PAN, L.; WANG, S.; KE, W.; LIANG, D.; DING, Y. A Precise Chloroplast Genome of Nelumbo Nucifera (Nelumbonaceae) Evaluated with Sanger, Illumina MiSeq, and PacBio RS II Sequencing Platforms: Insight into the Plastid Evolution of Basal Eudicots. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, dez. 2014.

YANG, Y.; MUZNY, D. M.; XIA, F.; NIU, Z.; PERSON, R.; DING, Y.; WARD, P.; BRAXTON, A.; WANG, M.; BUHAY, C.; VEERARAGHAVAN, N.; HAWES, A.; CHIANG, T.; LEDUC, M.; BEUTEN, J.; ZHANG, J.; HE, W.; SCULL, J.; WILLIS, A.; LANDSVERK, M.; CRAIGEN, W. J.; BEKHEIRNIA, M. R.; STRAY-PEDERSEN, A.; LIU, P.; WEN, S.; ALCARAZ, W.; CUI, H.; WALKIEWICZ, M.; REID, J.; BAINBRIDGE, M.; PATEL, A.; BOERWINKLE, E.; BEAUDET, A. L.; LUPSKI, J. R.; PLON, S. E.; GIBBS, R. A.; ENG, C. M. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. **JAMA**, v. 312, n. 18, p. 1870, 12 nov. 2014.

YUEN, R. K. C.; MERICO, D.; CAO, H.; PELLECCHIA, G.; ALIPANAHI, B.; THIRUVAHINDRAPURAM, B.; TONG, X.; SUN, Y.; CAO, D.; ZHANG, T.; WU, X.; JIN, X.; ZHOU, Z.; LIU, X.; NALPATHAMKALAM, T.; WALKER, S.; HOWE, J. L.; WANG, Z.; MACDONALD, J. R.; CHAN, A.; D'ABATE, L.; DENEAULT, E.; SIU, M. T.; TAMMIMIES, K.; UDDIN, M.; ZARREI, M.; WANG, M.; LI, Y.; WANG, J.; WANG, J.; YANG, H.; BOOKMAN, M.; BINGHAM, J.; GROSS, S. S.; LOY, D.; PLETCHER, M.; MARSHALL, C. R.; ANAGNOSTOU, E.; ZWAIGENBAUM, L.; WEKSBERG, R.; FERNANDEZ, B. A.; ROBERTS, W.; SZATMARI, P.; GLAZER, D.; FREY, B. J.; RING, R. H.; XU, X.; SCHERER, S. W. Genome-Wide Characteristics of de Novo Mutations in Autism. **NPJ genomic medicine**, v. 1, p. 160271–1602710, 3 ago. 2016.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The Impact of next-Generation Sequencing on Genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, n. 3, p. 95–109, mar. 2011a.

ZHANG, W.; CHEN, J.; YANG, Y.; TANG, Y.; SHANG, J.; SHEN, B. A Practical Comparison of De Novo Genome Assembly Software Tools for Next-Generation Sequencing Technologies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17915, 14 mar. 2011b.

ZUCCHI, R.; RONCA-TESTONI, S. The Sarcoplasmic Reticulum Ca2+ Channel/ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 1, p. 1–51, mar. 1997. Anexos

#### Anexo 1: termo de consentimento

#### CENTRO DE ESTUDOS DO GENOMA HUMANO

Termo de Consentimento Informado – Pesquisas de causas de deficiência intelectual ou anomalias congênitas por arrays genômicos e sequenciamento de exoma. FAPESP: 2009/00898-1

sangue minha e/ou de meu (minha) filho (a) para a realização do exame de array-CGH.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas. Entendo que:

- 1) O objetivo destes exames é verificar alteração de material genômico na amostra submetida (DNA).
- O exame é necessário para que uma possível causa da doença genética em questão seja identificada, mas não há nenhuma certeza de que a causa será encontrada.
- 3) Esse exame não oferece tratamento terapêutico.
- 4) Este exame não identifica alterações cromossômicas equilibradas.
- 5) Se for identificada alguma variante cromossômica não descrita será realizado exame dos pais para comparação.
- 6) Embora esse exame seja confiável e realizado com controle de qualidade, pode não ser informativo em alguns casos.
- 7)
- () Autorizo a divulgação dos resultados em publicações científicas, desde que dados pessoais sejam mantidos em sigilo.
- () Não autorizo a divulgação dos resultados em publicações científicas.
- () Autorizo a divulgação de fotografias em publicações científicas, desde que dados pessoais sejam mantidos em sigilo.
- ( ) Não autorizo a divulgação de fotografias em publicações científicas, desde que dados pessoais sejam mantidos em sigilo.

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

Data:

# BIOGRAFIA

## Thaise Nayane Ribeiro carneiro

## Formação acadêmica:

### 2016

Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Genética)

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Identificação da etiologia da deficiência intelectual esporádica por sequenciamento de exomas de afetados e seus pais.

Orientador: prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Carla Rosenberg.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

### 2009 – 2013

Graduação em Biomedicina

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

Título: Análise citotóxica do antraceno e fluoreno em células derivadas de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humana (A549).

Orientador: prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Sílvia Batistuzzo.

### Formação complementar

### 2015 – 2015

XI Course of the Latin American School of Human and Medical Genetics;

ELAG – Escola Latino-Americana de Genética Humana e Médica;

10 a 16 de maio de 2015,

Caxias do Sul, RS.

### 2015 – 2015

I Curso em Genômica na Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia;

Módulo: Introdução à Bioinformática e suas Aplicações"; 02 a 06 de fevereiro de 2015 Faculdade de Ciências Agronômicas/ UNESP, Botucatu, SP; Carga horária de 40 horas.

## 2014 - 2014

XIV Curso de verão: Genoma, Proteoma e o Universo celular: Oncologia, Célulastronco e Terapia Celular.

Janeiro/2014

Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP;

Carga horária: 80 horas.

# Atuação Profissional:

## Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2014 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda, Carga horária: 40h

## Liga Norte-rio-grandense contra o Câncer (LIGA), RN, Brasil.

2013-2013

Vínculo: Estagiária, Setor: Medicina Nuclear, Carga horária: 540h

## Universidade Feral do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

2013 - 2013

Vínculo: Estagiária, Setor: pesquisa – Laboratório de biologia e mutagênese ambiental, Carga horária: 540h.