

---

Giovanna Cantini Tolezano

Estudo das bases genéticas da microcefalia  
sindrômica associada a distúrbios de  
neurodesenvolvimento

Study of the genetic basis of syndromic  
microcephaly associated with neurodevelopmental  
disorders

São Paulo

2023

Giovanna Cantini Tolezano

**EXEMPLAR CORRIGIDO**

Estudo das bases genéticas da microcefalia  
sindrômica associada a distúrbios de  
neurodesenvolvimento

Study of the genetic basis of syndromic  
microcephaly associated with neurodevelopmental  
disorders

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São  
Paulo para a obtenção de Título de  
Doutora em Ciências na Área de  
Biologia (Genética).

Orientadora: Ana Cristina Victorino  
Krepischi

Coorientadora: Débora Romeo  
Bertola

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:  
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Giovanna, Cantini Tolezano

Estudo das bases genéticas da microcefalia  
sindrômica associada a distúrbios de  
neurodesenvolvimento / Giovanna Cantini Tolezano ;  
orientadora Ana Cristina Victorino Krepischi ;  
coorientadora Débora Romeo Bertola -- São Paulo,  
2023.

172 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas (Biologia Genética).

1. Microcefalia. 2. Neurodesenvolvimento. 3.  
Genética. I. Victorino Krepischi, Ana Cristina,  
orient. II. Romeo Bertola, Débora, coorient. Título.

# Comissão Julgadora

---

Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

---

Profa. Dra. Alexander Augusto de Lima Jorge

---

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

---

Profa. Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi  
Orientadora

# Dedicatória

---

A todos os pacientes e famílias participantes, sem os quais este trabalho não teria sido possível e a quem ele realmente se destina, e ao meu pai, maior e melhor biólogo que já tive a honra de conhecer.

## Epígrafe

---

*In many ways, the idea of a shared stock of genes drifting through the galaxy is far easier to accept than the daunting notion that none of us may ever have the intellectual capacity to understand how life truly works.*

Becky Chambers, *The Long Way to a Small, Angry Planet*

# Agradecimentos

---

Após quatro anos e meio de pós-graduação, há muitas pessoas a quem agradecer, tanto pela colaboração profissional quanto pelo apoio pessoal. Em primeiro lugar, à minha família, em especial aos meus pais, por sempre darem amparo às minhas escolhas e serem meus principais torcedores (e patrocinadores). E claro, ao Sirius, que toda noite vem ao meu quarto com os seus brinquedos me lembrar que é hora de parar de trabalhar e ir cuidar do que realmente é valioso nesta vida, e ao Danki, que faleceu uma semana antes da minha jornada como pós-graduanda oficialmente se iniciar e por quem eu teria renunciado àquela prova de ingresso se fosse me dar mais alguns dias com ele.

À minha orientadora, Ana Krepischi, pelos inestimáveis ensinamentos, pela parceria, amparo, paciência e encorajamento. Infelizmente nem todos têm a garantia de que terão um supervisor dedicado e disposto a sempre ajudar seus alunos a terem as melhores oportunidades e resultados, e neste sentido foi um grande privilégio te escolher e ser aceita em seu grupo lá em 2017. Agradeço também à minha coorientadora, Débora Bertola, que abraçou este trabalho quando ainda era um projeto de pesquisa incipiente e o ajudou a se transformar em uma tese da qual tenho muito orgulho.

Aos pacientes e famílias, que nos confiaram muito mais do que o seu material biológico ao aceitarem participar deste trabalho. Meu maior desejo, para além de um título, é ter podido contribuir de alguma forma no longo percurso em busca de um diagnóstico genético.

Aos amigos e colegas, tanto os da USP quanto os de fora, por compartilharem comigo dessa por vezes exaustiva jornada que é a pós-graduação. Os cafés, SBGs, desabafos e risadas foram fundamentais para que eu “continuasse a nadar” em meio aos oceanos da academia. Não quero esquecer de ninguém, mas também não posso deixar de agradecer nominalmente à Giovanna, Gustavo e Laura, e à Sara, melhor amiga com seu suporte incondicional e companheira máxima de divagações, desafoxos, fofocas, compras e alegrias; essa trajetória não teria sido tão rica sem você.

Ao corpo técnico do LGH – IB-USP, Israel, Lígia, Mara, Maraisa, Paulo e Silvia, e do CEGH-CEL – IB-USP, principalmente Daiane, Jaqueline, Marília e Patricia, cujas contribuições foram indispensáveis para que este trabalho fosse desenvolvido.

À professora Luciana Haddad, que me recebeu em seu laboratório e me ensinou mais do que eu esperava ter oportunidade de aprender depois das restrições decorridas da pandemia de Covid-19. As imunofluorescências que fiz no LGF estão entre os feitos mais bonitos da

minha carreira rs. Também agradeço ao Fábio, Natalia e Thiago, que me auxiliaram em diversos experimentos na reta final do doutorado.

Ao professor Alexander Jorge, que se dispôs a ajudar nesta pesquisa de várias maneiras, sempre com comentários e *insights* muito pertinentes e atenciosos.

À professora Merari Ferrari e à Andressa Sakugawa, que me receberam em seu laboratório e gentilmente se disponibilizaram a sanar minhas dúvidas e compartilhar de seu conhecimento (e materiais!) em biologia celular.

Ao Waldir Caldeira, do CAIMI – IB-USP, pela assistência no uso do microscópio confocal, passando manhãs e tardes inteiras procurando os melhores campos das lamínulas comigo.

À equipe da Unidade de Genética do ICr – HC-FMUSP e aos médicos colaboradores de fora de São Paulo – Carolina de Souza, Hélio van der Linden Jr. e Walter Fernandes –, fundamentais para a mediação entre os nossos resultados e o cuidado com os pacientes.

Aos professores Angela Vianna-Morgante, Carla Rosenberg, Paulo Otto e Regina Mingroni Netto, que estiveram presentes, interessados e disponíveis para discutir nossos dados e questionamentos em várias ocasiões, além de compartilharem de bons momentos de descontração nas nossas famosas pausas para o cafezinho da tarde.

Também é preciso agradecer a todos os funcionários da secretaria de pós-graduação do IB-USP, em especial Érika e Helder; à Helenice, da secretaria do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva; à Luceleni e aos coordenadores do programa em Biologia (Genética), professores Diogo Meyer e Tatiana Torres; e àqueles da tesouraria e setor de compras, principalmente Fernando, Leonice, Marcilene e Yoco. Aproveito para deixar o meu muito obrigada aos alunos que participaram da comissão de verba PROAP e sempre se dispuseram a responder as nossas intermináveis dúvidas.

Às agências de financiamento, CAPES (processo 1799650), CNPq (processos 157816/2018-4 e 140271/2020-1) e FAPESP (via CEPID CEGH-CEL – IB-USP), que contribuíram diretamente na minha trajetória acadêmica e cujo fomento à pesquisa é primordial para o caminhar da ciência neste estado e país.



## Lista de Siglas

---

AD	Autossômico Dominante
AR	Autossômico Recessivo
CMA	<i>Chromosomal Microarray Analysis</i>
CNV	<i>Copy Number Variant</i>
DI	Deficiência Intelectual
Indel	Inserção/deleção
MCPH	Microcefalia Primária Hereditária
NDD	<i>Neurodevelopmental Disorders</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NPC	<i>Neural Progenitor Cell</i>
OFC	<i>Occipitofrontal Circumference</i>
PC	Perímetro Cefálico
SD	<i>Standard Deviation</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
TEA	Transtorno do Espectro Autista
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance</i>
WES	<i>Whole-Exome Sequencing</i>
WGS	<i>Whole-Genome Sequencing</i>

# Índice

---

<b>Capítulo I: Introdução Geral.....</b>	<b>10</b>
<b>I.1. Aspectos evolutivos do cérebro humano moderno.....</b>	<b>10</b>
<b>I.2. Desenvolvimento embrionário do cérebro.....</b>	<b>11</b>
<b>I.3. Microcefalia .....</b>	<b>15</b>
<i>I.3.1. Mecanismos genéticos subjacentes à microcefalia e estratégias de investigação molecular.....</i>	<i>19</i>
<i>I.3.2. A microcefalia primária hereditária como subclasse e modelo de estudo .....</i>	<i>21</i>
<b>I.4. Justificativa do estudo .....</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo II: Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>II.1. Objetivos específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>Capítulo III: Materiais e Métodos .....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Casuística.....</b>	<b>29</b>
<b>III.2. Análise cromossômica por microarranjo genômico (<i>chromosomal microarray analysis</i> – CMA).....</b>	<b>31</b>
<b>III.3. Sequenciamento de exoma completo (<i>whole-exome sequencing</i> – WES).....</b>	<b>32</b>
<b>III.4. Sequenciamento Sanger.....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo IV: <i>Copy number variant</i> (CNV) como causa de microcefalia .....</b>	<b>36</b>
<b>Capítulo V: Achados genéticos monogênicos subjacentes à microcefalia síndrômica associada a NDD em uma coorte brasileira de 45 indivíduos.....</b>	<b>70</b>
<b>Capítulo VI: Síndromes de CNV com expressividade variável e penetrância reduzida – o caso da microduplicação 17p13.3.....</b>	<b>103</b>
<b>Capítulo VII: Discussão Geral e Conclusões.....</b>	<b>116</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>126</b>
<b><i>Abstract</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>154</b>

# Capítulo I: Introdução Geral

---

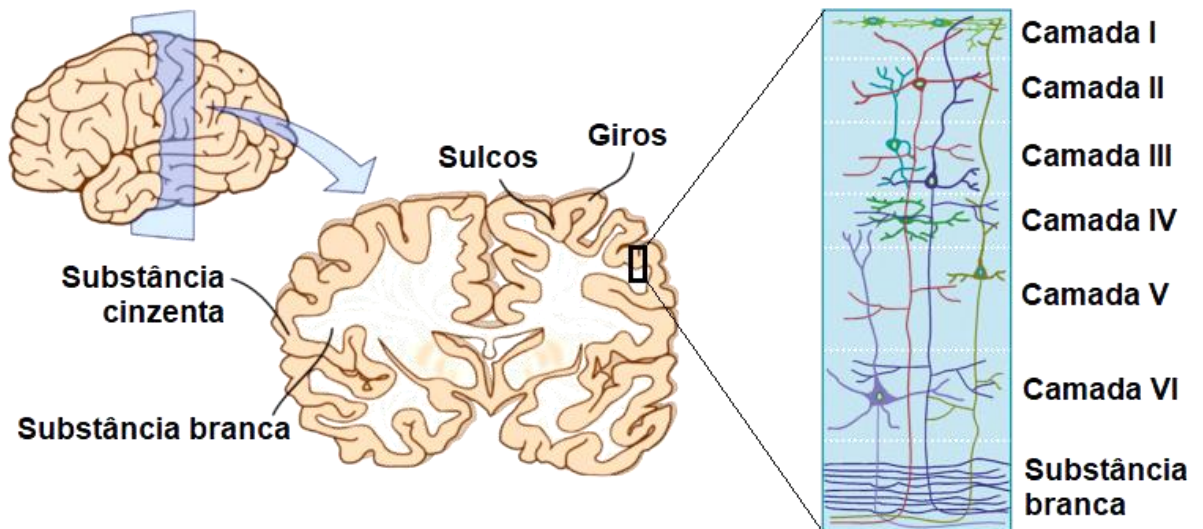
## I.1. Aspectos evolutivos do cérebro humano moderno

Dentre as características mais notáveis do *Homo sapiens* estão as habilidades cognitivas, sociais e comportamentais em comparação a outros animais, mamíferos ou não. Por este motivo, há muitas tentativas de delinear atributos morfológicos e fisiológicos específicos do cérebro humano moderno que poderiam ser responsáveis pela inegável capacidade evolutiva de adaptação e sobrevivência da espécie em relação aos homínídeos ancestrais (HERCULANO-HOUZEL, 2012; HOFMAN, 2014; MOLNÁR *et al.*, 2019; MASSIMO & LONG, 2022).

Um destes atributos morfológicos é o tamanho: os humanos têm um cérebro que é cerca de oito vezes maior do que o esperado com base na relação das dimensões corporais de um mamífero mediano (HERCULANO-HOUZEL, 2012; DICKE & ROTH, 2016). Apesar disso, o maior cérebro do reino animal não pertence a nenhum primata, em termos absolutos ou mesmo relativos ao tamanho do corpo. Em média, animais grandes apresentam cérebros grandes, e animais pequenos, cérebros pequenos, cabendo à baleia cachalote (*Physeter macrocephalus*) e ao elefante africano (*Loxodonta africana*) os cérebros de maior massa dentre as espécies existentes (10 e 6 kg, respectivamente, em contraste a 1,4 kg do *Homo sapiens*). Assim, no que diz respeito ao desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SNC), a expansão e especialização do cérebro, em particular do neocórtex, despontam como os maiores marcos da ordem Primata (HERCULANO-HOUZEL *et al.*, 2007; MONTGOMERY *et al.*, 2011; DICKE & ROTH, 2016; MORA-BERMÚDEZ *et al.*, 2016).

O neocórtex corresponde, filogeneticamente, à porção mais recente a evoluir no cérebro como atualmente visto nos mamíferos existentes: a superfície externa dos hemisférios cerebrais, com uma característica organização de seis camadas horizontais de células, compreendendo 80% do volume total do órgão (**Figura 1**). É considerado nos humanos a principal estrutura responsável pelo repertório de comportamentos e processamento de atividades cognitivas, executivas e comunicativas da espécie, incluindo o desenvolvimento da linguagem e da gramática (RAKIC, 2009; KAAS, 2011; MOLNÁR & POLLEN, 2014; DICKE & ROTH, 2016; KAAS, 2019).

**Figura 1.** Representação do neocórtex humano.



Em plano coronal, é possível visualizar o manto externo de substância cinzenta do cérebro com a substância branca subjacente. No detalhe à direita, a característica organização em seis camadas celulares do neocórtex. **Fonte:** adaptado de BRONNER & HATTEN (2013); MASSIMO & LONG (2022).

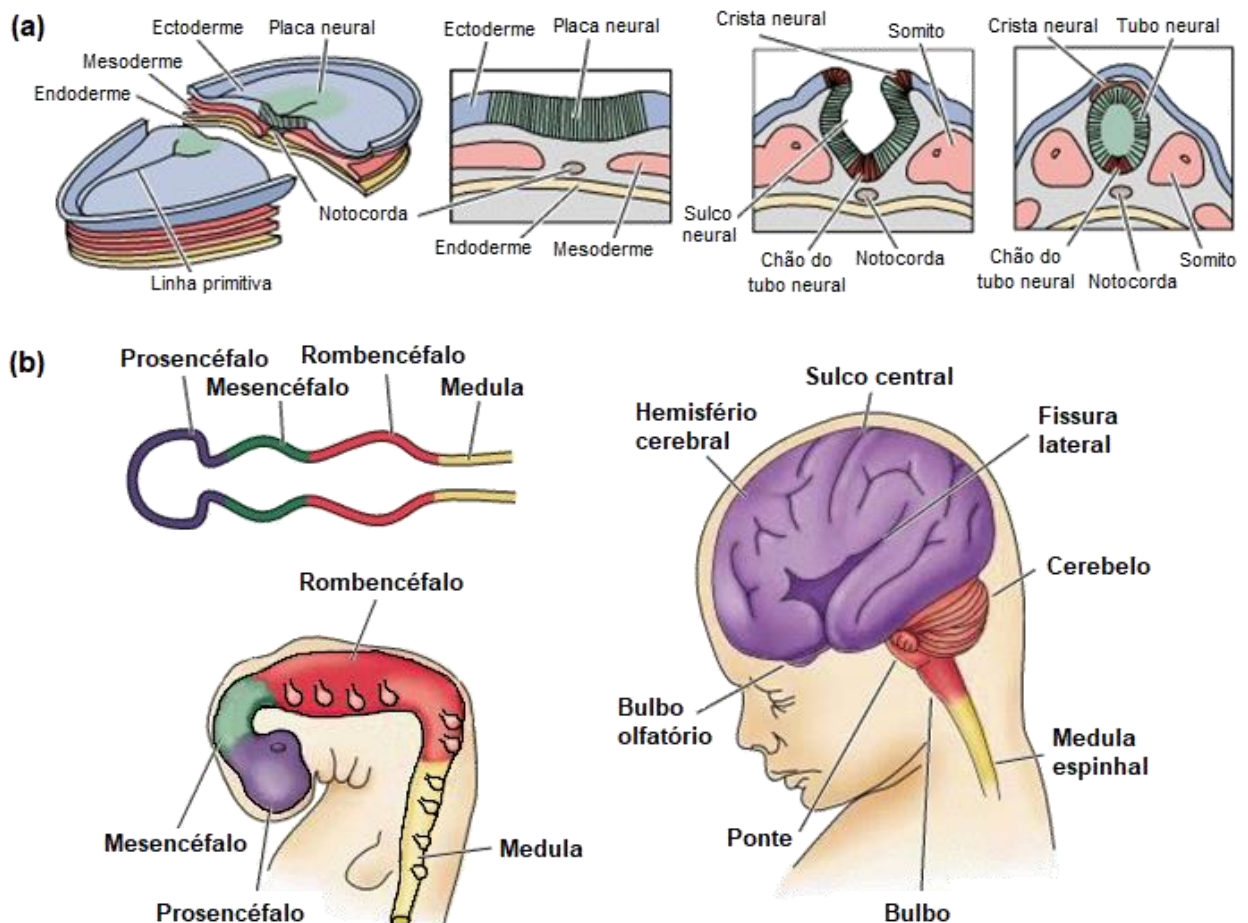
O neocórtex é uma região com cerca de 2.000 cm<sup>2</sup> de área de superfície e 3-5 mm de espessura. Subjacente a essa organização estrutural, o cérebro humano apresenta o maior número de neurônios corticais descrito no reino animal (cerca de 16 bilhões), combinado a uma alta capacidade de processamento de informações – garantida por rápida velocidade na condução de estímulos nervosos e razoável distância interneuronal –, o que dá ao neocórtex o papel crucial de pensamento, (auto)consciência, percepção, atenção e memória episódica no *Homo sapiens* (KAAS, 2011; HOFMAN, 2014; MOLNÁR & POLLEN, 2014; DICKE & ROTH, 2016).

## I.2. Desenvolvimento embrionário do cérebro

Para que desempenhe suas funções adequadamente, é fundamental que o neocórtex atinja tamanho e citoarquitetura apropriados. Em primatas e, mais marcadamente, em humanos, o aumento significativo do volume cortical criou a necessidade de que o tecido se dobrasse para acomodar toda a sua área de superfície, dando origem ao típico padrão de giros e sulcos do cérebro. Essa expansão do volume cortical é creditada a diferenças na capacidade proliferativa das células-tronco neuroprogenitoras (*neural progenitor cells* – NPCs), que permanecem em divisão por mais tempo no *Homo sapiens* antes de iniciarem a diferenciação celular em comparação a outros primatas como o chimpanzé (HOFMAN, 2014; MORA-BERMÚDEZ *et al.*, 2016; WILSCH-BRÄUNINGER & HUTTNER, 2021).

Assim, uma série de processos finamente orquestrados espacial e temporalmente precisa ocorrer para que o cérebro – e, conseqüentemente, o córtex – atinja a morfologia, área de superfície e volume esperados. Durante a embriogênese humana, por volta da 3ª semana de gestação, ocorre a gastrulação, quando são formados os três folhetos germinativos primários – ectoderme, mesoderme e endoderme. Derivada da mesoderme se desenvolve a notocorda, a haste celular que define o eixo primitivo do embrião e, dentre outras coisas, induz a formação da placa neural pelo espessamento da ectoderme. Posteriormente, a invaginação dessa placa neural origina o tubo neural, cerca de 22-24 dias pós-fertilização, caracterizando o processo de neurulação. Após o fechamento do tubo neural, este se segmenta em vesículas denominadas de prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e medula, que com o passar das semanas gestacionais irão se diferenciar nas estruturas finais que compõem o SNC (**Figura 2**) (SILBEREIS *et al.*, 2016; PENISSON *et al.*, 2019).

**Figura 2.** Desenvolvimento embrionário do sistema nervoso central.



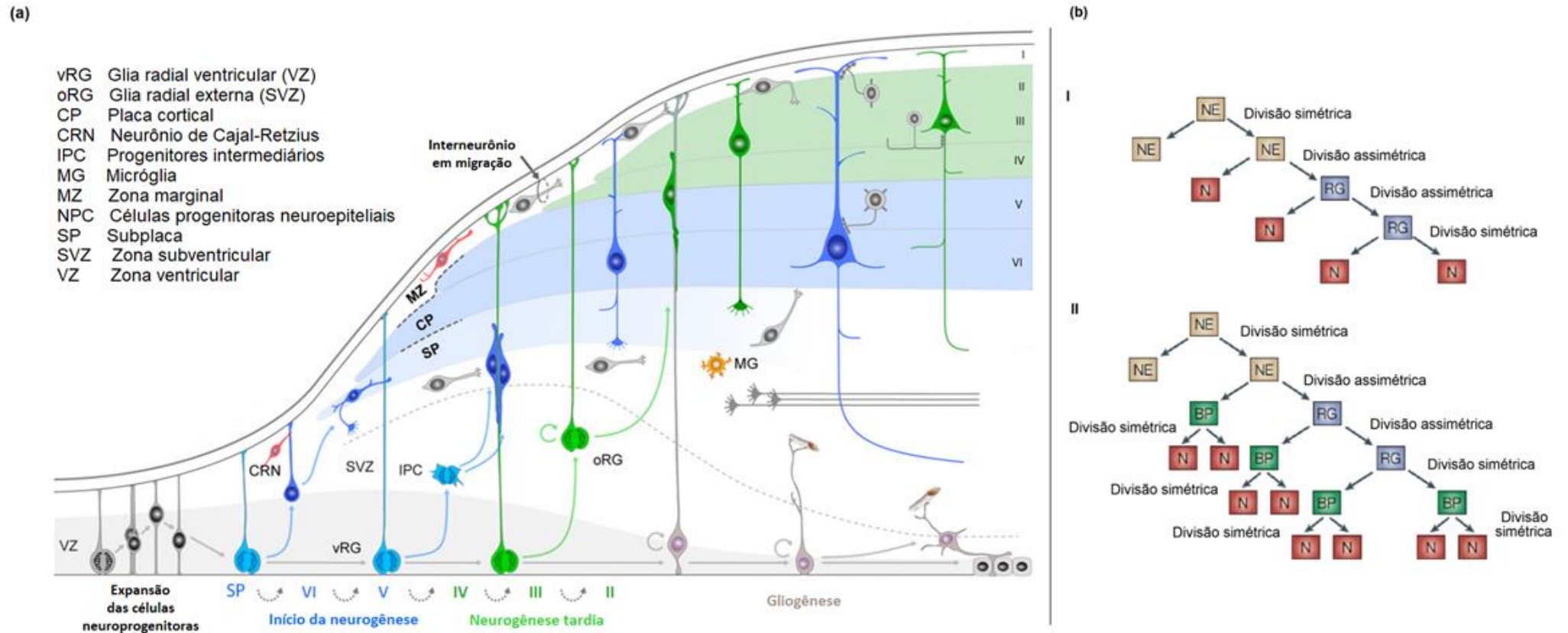
Em (a), a formação do tubo neural e em (b), sua segmentação em vesículas que posteriormente darão origem às estruturas finais do SNC. **Fonte:** adaptado de PURVES *et al.* (2001a, 2001b).

Para que a diferenciação das vesículas primitivas ocorra, o tubo neural, que se inicia como uma monocamada de tecido epitelial pseudoestratificado (neuroepitélio), passa por um

intenso período de divisão celular simétrica, isto é, com as duas células-filhas resultantes da mitose tendo a mesma identidade. É neste momento que é constituído o *pool* de NPCs do embrião, começando o desenvolvimento do córtex a partir da região anterior do tubo, o prosencéfalo (GÖTZ & HUTTNER, 2005; XING *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021). Essa acentuada proliferação celular transforma o neuroepitélio do córtex em formação em um tecido com múltiplas camadas, sendo a mais próxima ao lúmen do tubo denominada de zona ventricular; acima dela, está a zona subventricular, que se subdivide em interna e externa, então a zona intermediária, a placa cortical e a zona marginal. A partir da zona ventricular surge uma população transiente de células, a glia radial, com processos que se estendem através das camadas até a placa cortical. Com o início e progressão da neurogênese (processo de formação de neurônios), as divisões celulares se tornam, em grande proporção, assimétricas ao invés de simétricas, isto é, geram células-filhas de identidades diferentes entre si: uma glia radial e um progenitor basal, que futuramente dará origem a neurônios, ou, mais raramente, diretamente um neurônio pós-mitótico e uma glia radial. Os neurônios produzidos migram ao longo das camadas por meio dos processos das células da glia radial até atingirem a placa cortical, onde podem terminar a maturação e estender axônios e dendritos para iniciar a sinaptogênese e mielinização (**Figura 3**) (GÖTZ & HUTTNER, 2005; PINSON *et al.*, 2019; XING *et al.*, 2021).

Entretanto, a alta complexidade do SNC não se deve somente ao número de células, mas também à diversidade e quantidade de conexões (BELGACEM *et al.*, 2016). No neocórtex humano já formado, a organização de bilhões de neurônios excitatórios e inibitórios que se interconectam por meio de circuitos de comunicação de curtas e longas distâncias permite a coordenação das mais diversas respostas aos estímulos internos e externos. Essa complexa rede de conexões é considerada um dos principais alvos de atuação de processos evolutivos relacionados às funções cognitivas superiores dos primatas, já que alterações que perturbam a homeostase neuronal podem resultar em fenótipos de relevância médica (RAMOCKI & ZOGHBI, 2008; HOFMAN, 2014; MOLNÁR *et al.*, 2019; MASSIMO & LONG, 2022).

**Figura 3.** Representação das etapas da neurogênese humana.



(a) Processo de geração e migração de células nervosas a partir da 12<sup>a</sup> semana gestacional, originando um tecido de múltiplas camadas. Posteriormente, a zona marginal representará a camada I do neocórtex, e a placa cortical, as camadas II-VI. Ao lado esquerdo da figura, os estágios celulares envolvidos neste processo. (b) Esquemática dos processos de divisão simétrica e assimétrica das células-tronco neuroprogenitoras sem **I** e com **II** progenitores basais como intermediários na geração de neurônios. **Fonte:** adaptado de GÖTZ & HUTTNER, 2005; MOLNÁR *et al.*, 2019.

### I.3. Microcefalia

Dado o intrincado desenvolvimento do SNC, perturbações em qualquer etapa deste processo levam a anormalidades cerebrais em humanos, como é o caso da microencefalia (“cérebro pequeno”) – termo tradicionalmente usado de forma intercambiável com microcefalia (“cabeça pequena”), uma vez que a caixa craniana cresce para acompanhar o aumento do volume do cérebro (GILMORE & WALSH, 2013; DEVAKUMAR *et al.*, 2018). Esta condição, considerada um defeito de proliferação, abundância e funcionamento celular (PINSON *et al.*, 2019), é definida clinicamente pela redução do perímetro cefálico (PC) da cabeça em pelo menos dois desvios padrões (*standard deviations* – SD) da média, tendo como parâmetro indivíduos de mesmo sexo e idade (BOONSAWAT *et al.*, 2019). O PC segue um padrão normal de distribuição, estimando-se que a microcefalia acometa de 2-3% da população mundial, embora a maioria dos casos seja de pessoas híginas (WOODS & PARKER, 2013; DEVAKUMAR *et al.*, 2018). No entanto, por refletir volume cerebral, PCs inferiores servem como importante fator de risco para atraso do desenvolvimento cognitivo e motor originado por problemas de formação do cérebro – especialmente do córtex. Dessa forma, a microcefalia é um traço frequente em coortes de distúrbios de neurodesenvolvimento (*neurodevelopmental disorders* – NDD), acometendo entre 15-41% dos pacientes investigados (WOODS, 2004; HARRIS, 2015; MASIH *et al.*, 2022).

O principal achado clínico associado à microcefalia é a deficiência intelectual (DI) (GILMORE & WALSH, 2013; VON DER HAGEN *et al.*, 2014). Considerada o distúrbio de desenvolvimento mais comum da espécie humana, é caracterizada pela limitação cognitiva e do comportamento adaptativo devido à disfunção ou aquisição mais lenta dos marcos de desenvolvimento psicomotor (CHIURAZZI & PIROZZI, 2016; JANSEN *et al.*, 2023). Não é possível identificar uma correlação exata entre o grau de microcefalia e o desempenho intelectual (BOONSAWAT *et al.*, 2019), principalmente porque fatores adicionais, como malformações cerebrais e epilepsia, são mais frequentes em associação a PCs menores e contribuem para o prejuízo cognitivo (BOLDUC & SHEVELL, 2005; ABUELO, 2007; DUERINCKX *et al.*, 2021). No entanto, um estudo com 41 crianças de sete anos de idade relatou uma tendência de associação entre o decréscimo do PC e diminuição do quociente de inteligência (QI, um dos testes usados para diagnóstico de DI, cuja média populacional é definida como 100): dentre o grupo com PC de -2 a -3 SD, 86% tinham QI > 100, enquanto 10% tinham QI < 70. Com valores de PC < -3 SD, nenhuma criança apresentava QI > 100 e 51% estavam < 70 (DOLK, 1991). Assim, alguns autores fazem a distinção entre microcefalia



leve, em que o PC se encontra entre -2 e -3 SD, e microcefalia grave, quando o PC é < -3 SD e mais provável de estar associada a DI e/ou outras alterações clinicamente relevantes (ASHWAL *et al.*, 2009; DUERINCKX *et al.*, 2021; MASIH *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que a microcefalia se trata de uma condição heterogênea e não de uma doença única específica (VON DER HAGEN *et al.*, 2014). Considerando o período de detecção, quando é identificada ao nascimento denomina-se congênita (ou primária), resultado de perturbações no início da neurogênese; quando decorre de problemas tardios de desenvolvimento, funcionamento e manutenção celular, como nos processos de mielinização, sinaptogênese e gliogênese, é classificada como pós-natal, podendo refletir também defeitos formativos ou ocasionar em morte neuronal exacerbada (GILMORE & WALSH, 2013; BOONSAWAT *et al.*, 2019; MASIH *et al.*, 2022). A literatura científica da área destaca duas categorias da condição: microcefalia não-sindrômica, que se apresenta de forma isolada ou em associação a anormalidades na morfologia cerebral, DI/atraso de desenvolvimento, epilepsia, transtornos neuropsiquiátricos e comportamentais, dismorfismos faciais e/ou baixa estatura, e a sindrômica, na qual a microcefalia é apenas um dos sinais clínicos juntamente a pelo menos uma malformação em um órgão externo ao SNC (ABUELO, 2007; SHAHEEN *et al.*, 2019). No entanto, a fronteira entre um quadro sindrômico e não-sindrômico é tênue e difícil de delimitar, a depender da coleta de sinais clínicos em detalhes e da realização de exames específicos complementares. É possível argumentar que a presença de qualquer traço adicional à microcefalia, mesmo DI, epilepsia, dismorfismos faciais ou baixa estatura, poderia caracterizar um caso como sindrômico (SHAHEEN *et al.*, 2019).

Tendo isso em conta, estudos com grandes coortes de pacientes com microcefalia têm corroborado a DI como a principal comorbidade, além de epilepsia; alterações comportamentais, incluindo transtorno do espectro autista (TEA); malformações cerebrais diversas; dismorfismos faciais; distúrbios oftalmológicos e perda auditiva; anomalias do sistema musculoesquelético; defeitos cardiovasculares e dos tratores gastrointestinal e urinário (VON DER HAGEN *et al.*, 2014; RUMP *et al.*, 2016; BOONSAWAT *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; DAWIDZIUK *et al.*, 2021; MASIH *et al.*, 2022). Adicionalmente, a frequência alta de associação de baixa estatura com microcefalia leva à classificação de microcefalia proporcional quando altura e peso também se encontram  $\leq 2$  SD (HANZLIK & GIGANTE, 2017). Tais dados reforçam o vasto espectro de apresentação fenotípica dos quadros sindrômicos, resultando em dificuldade de caracterização mais precisa da associação da microcefalia com

outros achados, visto que muitas alterações específicas aparecem uma única vez dentro de uma coorte.

As alterações cerebrais estruturais, em particular, são de alta relevância na investigação da microcefalia. Embora a maioria dos achados de neuroimagem sejam inespecíficos e não apontem para um diagnóstico claro, a realização de exames, como ressonância magnética e tomografia computadorizada de crânio, é importante tanto pela elevada frequência de anormalidades em indivíduos microcefálicos, quanto pela possibilidade de direcionar o manejo clínico (VON DER HAGEN *et al.*, 2014). A simplificação do padrão de giros é a malformação cerebral mais prevalente em microcefalia, embora defeitos no corpo caloso, no cerebelo, alterações na substância branca e na migração celular (polimicrogiria, lissencefalia) também sejam recorrentes (PIROZZI *et al.*, 2018; OKAFOR & KANEKAR, 2022).

A **Tabela 1** mostra um compilado de frequências dos achados clínicos recorrentes observados em diferentes estudos de pacientes com microcefalia sindrômica.

Uma terceira maneira relevante de se classificar a microcefalia é quanto à etiologia, que pode ser predominantemente ambiental ou genética, ou ainda multifatorial (ALCANTARA & O'DRISCOLL, 2014). Dentre os fatores ambientais de risco alto se destacam como principais causas as infecções intrauterinas e perinatais (como Zika vírus, citomegalovírus, toxoplasmose e rubéola), exposição materna a teratógenos durante a gestação (álcool, cocaína, radiação), hipóxia no período perinatal, desnutrição no pós-natal e traumas mecânicos ou outros eventos prejudiciais (por exemplo, acidente vascular cerebral) durante o desenvolvimento (VON DER HAGEN *et al.*, 2014). Entretanto, investigações de grandes coortes microcefálicas vêm apontando que apenas ~25% das ocorrências teriam etiologia ambiental, com os 75% restantes se dividindo entre origem genética do distúrbio identificada e casos idiopáticos (VON DER HAGEN *et al.*, 2014; MEDEIROS FIGUEIREDO *et al.*, 2021; NUNEZ *et al.*, 2022). Não obstante, estima-se que 20-30% dos casos de microcefalia primária identificados por volta do terceiro trimestre gestacional sejam devido a causas genéticas (CHEN *et al.*, 2022).

**Tabela 1.** Frequência dos achados clínicos em diferentes estudos com coortes de microcefalia sindrômica.

Achados clínicos	Frequência nos trabalhos analisados (n pacientes/n total)					
	VON DER HAGEN <i>et al.</i> (2014)	RUMP <i>et al.</i> (2016)	BOONSAWAT <i>et al.</i> (2019)	LEE <i>et al.</i> (2020)	DAWIDZIUK <i>et al.</i> (2021)	MASIH <i>et al.</i> (2022)
Atraso global do desenvolvimento/DI	65% (442/680)	95% (36/38)	90% (58/61)	100% (40/40)	88% (168/191)	94% (82/87)
Alterações cerebrais estruturais	63% (310/491)	80% (28/35)	63% (27/43)	15% (6/40)	70% (133/191)	73% (48/66)
Epilepsia	43% (292/680)	34% (13/38)	26% (16/61)	68% (27/40)	58% (111/191)	41% (36/87)
Alterações comportamentais	---	24% (9/38)	23% (14/61)	10% (4/40)	---	27% (24/90)
Baixa estatura	42% (288/680)	34% (13/38)	33% (20/61)	65% (26/40)	32% (61/191)	60% (52/87)
Dismorfismos faciais	19% (127/680)	18% (7/38)	---	70% (28/40)	39% (75/191)	82% (74/90)
Distúrbios oftalmológicos	30% (207/680)	26% (10/38)	10% (6/61) <sup>a</sup>	8% (3/40)	14% (27/191) <sup>a</sup>	46% (30/66)
Perda auditiva	8% (51/680)	8% (3/38)	10% (6/61)	8% (3/40)	7% (13/191)	15% (8/52)
Anomalias músculoesqueléticas	13% (91/680)	32% (12/38)	---	10% (4/40) <sup>b</sup>	---	26% (23/90) <sup>b</sup>
Defeitos cardiovasculares	14% (93/680)	13% (5/38)	7% (4/61)	20% (8/40)	10% (19/191)	---
Defeitos gastrointestinais	9% (58/680)	13% (5/38)	---	5% (2/40)	---	---
Defeitos geniturinários	13% (89/680)	26% (10/38)	---	5% (2/40)	---	---

DI: deficiência intelectual. <sup>a</sup>Os dados disponibilizados são referentes apenas a estrabismo. <sup>b</sup>Referente apenas a alterações esqueléticas. A notação “---” indica que o dado não estava descrito no estudo.

### *1.3.1. Mecanismos genéticos subjacentes à microcefalia e estratégias de investigação molecular*

Uma variedade de mecanismos genéticos já foi descrita como causa de microcefalia, incluindo aneuploidias cromossômicas; alterações cromossômicas estruturais, que incluem as variantes de números de cópias genômicas (*copy number variant* – CNVs [deleções e duplicações]); defeitos de *imprinting* genômico e distúrbios monogênicos (autossômicos dominantes [AD] e recessivos [AR], ligados ao X dominantes e recessivos) (ABUELO, 2007; VON DER HAGEN *et al.*, 2014; PIROZZI *et al.*, 2018). Evidenciando sua alta heterogeneidade, há 1.164 entradas no banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) para condições que incluem microcefalia dentre sua apresentação clínica e que têm base molecular conhecida, embora para outras 63 entradas ainda não se tenha a etiologia molecular do distúrbio identificada (consulta em janeiro/2023). Ademais, aproximadamente 800 genes já foram identificados como causa de microcefalia quando alterados, afetando as mais diversas funções biológicas, como controle do ciclo celular, vias de resposta a danos no DNA, vias de sinalização celular, metabolismo de macromoléculas e transcrição gênica (ABUELO, 2007; PIROZZI *et al.*, 2018; SISKOS *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado na Alemanha com 680 crianças com microcefalia (VON DER HAGEN *et al.*, 2014), os testes diagnósticos utilizados incluíram cariotipagem, análise de quebras para síndromes de instabilidade cromossômica, microarranjo genômico (*chromosomal microarray analysis* – CMA) e sequenciamento de genes selecionados (quando o fenótipo era altamente sugestivo de uma condição em particular). Foram encontradas mutações genéticas causativas do fenótipo em cerca de metade dos casos com etiologia esclarecida (29%); ainda assim, em 41% dos indivíduos microcefálicos a origem do quadro permaneceu idiopática, embora os autores creditem no mínimo 13% destes casos à presença de alterações genéticas não identificadas, dada a presença de múltiplos afetados em uma mesma família, consanguinidade parental ou suspeita de doença mitocondrial não investigada. Este cenário se repete em diversos estudos: em muitos casos não é possível estabelecer uma hipótese diagnóstica para o quadro clínico dos pacientes com microcefalia, considerando sua notável heterogeneidade etiológica e clínica. Portanto, abordagens baseadas em investigação do genoma completo (*genome-wide approach*), de maneira não direcionada, devem ser priorizadas, em particular testes como CMA e sequenciamento de exoma completo (*whole-exome sequencing* – WES) (VISSERS *et al.*, 2016; BOONSAWAT *et al.*, 2019) ou genoma completo (*whole-genome sequencing* – WGS) (MCMILLAN *et al.*, 2021).

O CMA é uma técnica de citogenética molecular que consiste na utilização de um microarranjo composto por sondas moleculares com sequências mapeadas por todo o genoma, visando à prospecção de CNVs. Este teste oferece resolução superior a do cariótipo convencional: aproximadamente 50 kb (variável de acordo com o número de sondas) *versus* 5-10 Mb no cariótipo com bandamento (MILLER *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2019). Plataformas baseadas em sondas contendo polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs), denominadas de SNP-array, também permitem a detecção de grandes regiões em homozigose, oriundas de dissomia uniparental ou consanguinidade parental (HENDERSON *et al.*, 2014). Para indivíduos com DI ou atraso de desenvolvimento, TEA e/ou malformações congênitas, a taxa de diagnóstico molecular utilizando CMA é aproximadamente 15-20%, contrastando com 3-5% obtido apenas com cariótipo; por este motivo, foi considerada até recentemente a técnica-ouro de investigação genética neste grupo de pacientes, incluindo indivíduos com microcefalia (MILLER *et al.*, 2010; HENDERSON *et al.*, 2014; CAPKOVA *et al.*, 2019). Apesar da técnica de CMA ter aumentado extraordinariamente a resolução e a capacidade de análise em citogenética, sendo poderosa na identificação de ganhos e perdas de CNVs, não permite a detecção de rearranjos cromossômicos balanceados, como inversões e translocações equilibradas, tampouco detecta variantes de nucleotídeo único (*single nucleotide variants* – SNVs) ou pequenas inserções/deleções < 1 kb (indels) (SILVA *et al.*, 2019).

O advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing* – NGS), em especial o WES, possibilitou o aumento na taxa de diagnóstico molecular para pacientes com NDD (de 15-20% no CMA para ~50% no WES), além de resultar na identificação de genes novos como causa de condições monogênicas (VISSERS *et al.*, 2016). O exoma passou então a ser considerado o teste padrão-ouro para tais condições, uma vez que permite não só a identificação de mutações de ponto na porção codificadora do genoma (SNVs e indels), mas também a análise de CNVs (SRIVASTAVA *et al.*, 2019). No entanto, o WES possui limitações, decorrentes principalmente da forma como a técnica de sequenciamento é estruturada: a captura de regiões-alvo é ineficiente em regiões repetitivas, ricas em nucleotídeos GC e em sítios de *splicing*, além de ser uma técnica limitada para a detecção e delimitação de tamanho de algumas CNVs, também não permitindo a identificação da grande maioria dos rearranjos estruturais balanceados e de variantes regulatórias não-exômicas (MEIENBERG *et al.*, 2016; CLARK *et al.*, 2018). O WGS se destaca, então, como a ferramenta atualmente mais promissora no diagnóstico de doenças genéticas, uma vez que, por fornecer uma cobertura uniforme de sequenciamento ao longo do genoma, possibilita a

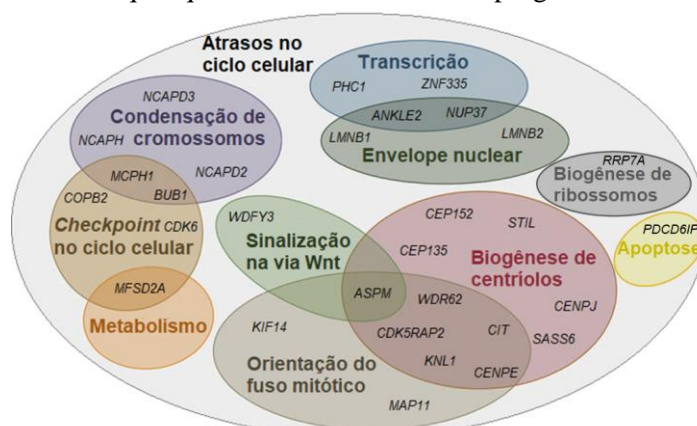
detecção de vários tipos de variantes sem os vieses do WES, se mostrando mais efetiva na investigação molecular de NDD. No momento atual, os principais gargalos para a ampla utilização do sequenciamento de genoma como teste genético de primeira linha é seu custo ainda elevado, bem como a grande complexidade de análise dos dados (VAN DER SANDEN *et al.*, 2023).

### 1.3.2. A microcefalia primária hereditária como subclasse e modelo de estudo

A despeito de sua heterogeneidade, uma subclasse de microcefalia de origem genética se destaca: a microcefalia primária hereditária (MCPH). A MCPH se caracteriza como um conjunto de doenças raras em que a microcefalia está presente desde o nascimento e geralmente é progressiva, estando ausentes outros defeitos congênitos externos ao SNC, à exceção de baixa estatura e dismorfismos faciais (isto é, não-sindrômica) (SHAHEEN *et al.*, 2019; JEAN *et al.*, 2020). Ela é mais frequentemente identificada em populações consanguíneas, nas quais a incidência pode chegar a 1/10.000 nascimentos *versus* 1/250.000 em outras populações (FAHEEM *et al.*, 2015).

Até o momento, há 30 genes descritos como causa de MCPH, sendo 27 associados a condições com herança AR e três com herança AD (FAROOQ *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2020; SISKOS *et al.*, 2021; CARVALHAL *et al.*, 2022). Embora cada um desses genes desempenhe uma função específica, é sabido que estas formas de microcefalia se originam em decorrência da redução do número de neurônios no neocórtex e devido a perturbações na regulação do ciclo celular. Assim, uma característica comum a todos esses genes é a sua atuação em etapas-chave para o prosseguimento das mitoses durante o desenvolvimento embrionário do SNC (**Figura 4; Tabela 2**) (JEAN *et al.*, 2020).

**Figura 4.** Processos biológicos nos quais atuam as proteínas codificadas pelos genes de MCPH que, quando mutados, afetam a progressão do ciclo celular.



Fonte: adaptado de JEAN *et al.* (2020).

**Tabela 2.** Genes de MCPH, processos celulares associados e condições clínicas derivadas com respectivos padrões de herança.

Gene	Função celular	Condição associada	Padrão de herança
<i>MCPH1</i> (OMIM *607117)	Condensação de cromossomos, <i>checkpoint</i> do ciclo celular, resposta a danos no DNA	MCPH1 (OMIM #251200)	AR
<i>WDR62</i> (OMIM *613583)	Biogênese de centríolos, nucleação de microtúbulos, orientação do fuso mitótico	MCPH2 (OMIM #604317)	AR
<i>CDK5RAP2</i> (OMIM *608201)	Nucleação de microtúbulos, união entre centríolos, citocinese, orientação do fuso mitótico, estruturação da matriz pericentriolar	MCPH3 (OMIM #604804)	AR
<i>KNL1</i> (OMIM *609173)	Ligação do cinetócoro às fibras do fuso, <i>checkpoint</i> do ciclo celular	MCPH4 (OMIM #604321)	AR
<i>ASPM</i> (OMIM *605481)	Biogênese de centríolos, orientação do fuso mitótico, citocinese, sinalização na via Wnt	MCPH5 (OMIM #608716)	AR
<i>CENPJ</i> (OMIM *609279)	Biogênese de centríolos, ligação da matriz pericentriolar aos centríolos	MCPH6 (OMIM #608393)	AR
<i>STIL</i> (OMIM *181590)	Biogênese de centríolos	MCPH7 (OMIM #612703)	AR
<i>CEP135</i> (OMIM *611423)	Biogênese de centríolos	MCPH8 (OMIM #614673)	AR
<i>CEP152</i> (OMIM *613529)	Biogênese de centríolos	MCPH9 (OMIM #614852)	AR
<i>ZNF335</i> (OMIM *610827)	Regulação transcricional	MCPH10 (OMIM #615095)	AR
<i>PHC1</i> (OMIM *602978)	Remodelador da cromatina	MCPH11 (OMIM #615414)	AR
<i>CDK6</i> (OMIM *603368)	<i>Checkpoint</i> do ciclo celular	MCPH12 (OMIM #616080)	AR
<i>CENPE</i> (OMIM *117143)	Ligação do cinetócoro às fibras do fuso, <i>checkpoint</i> do ciclo celular	MCPH13 (OMIM #616051)	AR
<i>SASS6</i> (OMIM *609321)	Biogênese de centríolos	MCPH14 (OMIM #616402)	AR
<i>MFS2A</i> (OMIM *614397)	<i>Checkpoint</i> do ciclo celular, transporte pela barreira hematoencefálica	MCPH15 (OMIM #616486)	AR
<i>ANKLE2</i> (OMIM *616062)	Desmontagem do envelope nuclear	MCPH16 (OMIM #616681)	AR
<i>CIT</i> (OMIM *605629)	Nucleação de microtúbulos, citocinese, orientação do fuso mitótico	MCPH17 (OMIM #617090)	AR
<i>WDFY3</i> (OMIM *617485)	Sinalização na via Wnt	MCPH18 (OMIM #617520)	AD
<i>COPB2</i> (OMIM *606990)	Tráfego intracelular, <i>checkpoint</i> do ciclo celular	MCPH19 (OMIM #617800)	AR
<i>KIF14</i> (OMIM *611279)	Citocinese, estabilização de microtúbulos	MCPH20 (OMIM #617914)	AR
<i>NCAPD2</i> (OMIM *615638)	Condensação de cromossomos, separação de cromátides-irmãs	MCPH21 (OMIM #617983)	AR
<i>NCAPD3</i> (OMIM *609276)	Condensação de cromossomos, separação de cromátides-irmãs	MCPH22 (OMIM #617984)	AR
<i>NCAPH</i> (OMIM *602332)	Condensação de cromossomos, separação de cromátides-irmãs	MCPH23 (OMIM #617985)	AR
<i>NUP37</i> (OMIM *609264)	Ligação do cinetócoro às fibras do fuso, complexo dos poros nucleares	MCPH24 (OMIM #618179)	AR
<i>TRAPPC14</i> (OMIM *618350)	Citocinese, estabilização de microtúbulos	MCPH25 (OMIM #618351)	AR
<i>LMNB1</i> (OMIM *150340)	Composição da lâmina nuclear	MCPH26 (OMIM #619179)	AD
<i>LMNB2</i> (OMIM *150341)	Composição da lâmina nuclear	MCPH27 (OMIM #619180)	AD
<i>RRP7A</i> (OMIM *619449)	Biogênese de ribossomos, reabsorção dos cílios primários, desenvolvimento do neocórtex, neurogênese	MCPH28 (OMIM #619453)	AR
<i>PDCD6IP</i> (OMIM *608074)	Apoptose, citocinese, reparo da membrana plasmática	MCPH29 (OMIM #620047)	AR
<i>BUB1</i> (OMIM *602452)	Separação de cromátides-irmãs, <i>checkpoint</i> do ciclo celular	MCPH30 (OMIM #620183)	AR

**Fonte:** adaptado de FAROOQ *et al.* (2020); KHAN *et al.* (2020); SISKOS *et al.* (2021); CARVALHAL *et al.* (2022).

Há algumas hipóteses para explicar a menor quantidade de neurônios corticais em pacientes com microcefalia a partir da investigação da MCPH, como aumento da morte celular, desequilíbrio entre taxa de proliferação e diferenciação celular, alterações na duração de cada fase da divisão e diferenciação celular anormal. Em particular, perturbações nos centrossomos são consideradas críticas, uma vez que 30% dos genes já relacionados à microcefalia congênita estão associados a essa estrutura. Mais ainda, termos como “centrossomo” e “centro organizador de microtúbulos” representam dois dos componentes celulares com maior enriquecimento ontológico para os genes de MCPH (JEAN *et al.*, 2020; ROBINSON *et al.*, 2020; ZAQOUT & KAINDL, 2021).

O centrossomo é uma organela composta por um par de centríolos envoltos em uma matriz proteica, denominada de matriz pericentriolar. Sua função é servir como o principal local de nucleação de microtúbulos nas células animais, estando envolvido em processos cruciais da divisão, migração e diferenciação celular. Essa estrutura possibilita a formação do fuso mitótico e do citoesqueleto, a motilidade, adesão e polaridade das células, o tráfego intracelular e a construção de cílios (KUIJPERS & HOOGENRAAD, 2011; O’NEILL *et al.*, 2018). Embora o centrossomo esteja presente de forma ubíqua nos mais diversos tipos celulares, sua função é especialmente importante no cérebro em desenvolvimento: os microtúbulos atuam ativamente na modulação do tamanho e da configuração dos neurônios – cílios primários, por exemplo, formados a partir dos centrossomos, são estruturas-chave em vias de sinalização com atividade reconhecida na manutenção das células neuroprogenitoras do neocórtex, como a *Sonic hedgehog* (KUIJPERS & HOOGENRAAD, 2011; YANG *et al.*, 2021). Assim, defeitos em diversos genes associados ao centrossomo e seus processos são causa importante de distúrbios de neurodesenvolvimento, como a microcefalia (MEGRAW *et al.*, 2011).

Dois dos principais mecanismos propostos para justificar o impacto de alterações em genes de centrossomo no desenvolvimento cerebral são o aumento de apoptose e a diferenciação precoce das NPCs (O’NEILL *et al.*, 2018; ZAQOUT & KAINDL, 2021). Na primeira situação, erros na formação e estabilização do fuso mitótico causariam atrasos na divisão celular; na impossibilidade de correção do problema, haveria a interrupção do ciclo celular e eventual apoptose, limitando a manutenção da linhagem e, conseqüentemente, provocando a diminuição do volume cerebral. Este caso vai ao encontro do achado de redução do número de neurônios derivada de aumento de morte celular identificada em camundongos *knock-out* para os genes *CDK5RAP2* e *MCPH1* (GILMORE & WALSH, 2013). Já na segunda situação (diferenciação precoce), alterações na orientação do plano de clivagem das células



neuroprogenitoras levariam ao aumento da ocorrência das divisões celulares assimétricas, antes do estabelecimento adequado do *pool* de NPCs com capacidade proliferativa, que ocorre por divisões simétricas. Como o momento de ocorrência dessas divisões é crítico, considerando que quanto mais cedo elas resultem em neurônios já diferenciados, menor será o número final de células no cérebro, uma vez que não haverá novas divisões a partir deles, o fenótipo resultante seria a microcefalia (GILMORE & WALSH, 2013; ZAQOUT & KAINDL, 2021). Em particular, ensaios funcionais em linhagem celular com RNA de interferência para o gene *ASPM* corroboraram esta hipótese pela constatação de perturbações na orientação do fuso mitótico (HIGGINS *et al.*, 2010; GILMORE & WALSH, 2013).

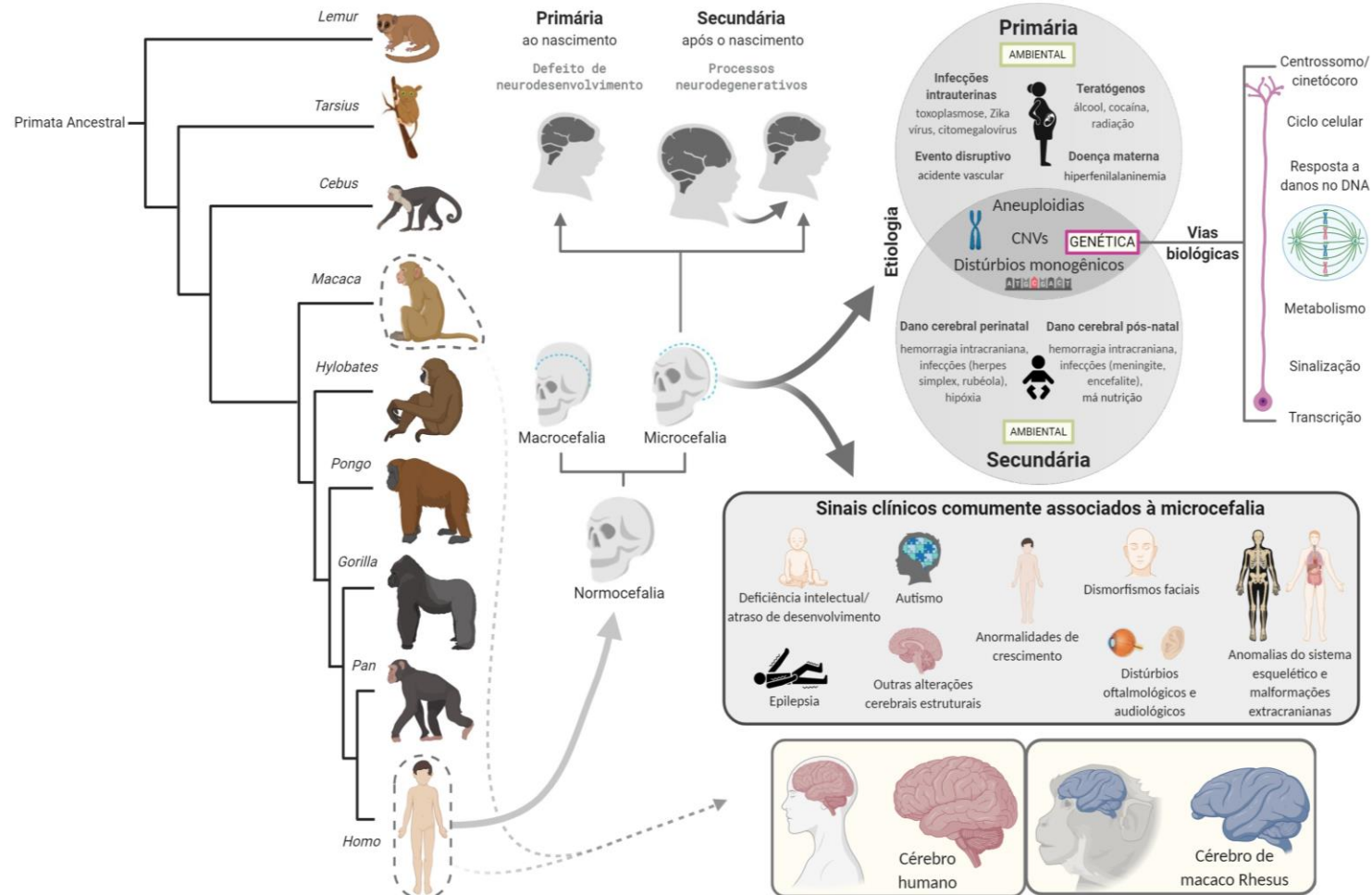
É importante ter em mente, no entanto, que ainda é incerto o motivo pelo qual genes de centrôssomo com funções celulares distintas ocasionam o mesmo fenótipo. Também não há consenso na literatura sobre o motivo do comprometimento ficar restrito, em grande parte, ao desenvolvimento cerebral, já que a maioria das proteínas codificadas a partir destes genes não apresentam padrão de expressão tecido-específico. Uma possibilidade aventada seria a de que as células neuroprogenitoras são mais sensíveis a disfunções do ciclo celular, influenciado diretamente pelo centrôssomo (GILMORE & WALSH, 2013; JEAN *et al.*, 2020).

Além da importância médica dos casos de microcefalia em geral, e da MCPH em particular, a redução patológica do cérebro humano retoma também o estudo do desenvolvimento evolutivo do SNC, uma vez ter sido demonstrado que *ASPM*, *CENPJ*, *CDK5RAP2* e *MCPHI* sofreram seleção positiva durante a evolução dos primatas (MONTGOMERY *et al.*, 2011). O acúmulo de certas mutações nestes genes ao longo da evolução teria contribuído para o aumento do tamanho cerebral do *Homo sapiens* moderno, de forma que indivíduos microcefálicos com variantes de perda de função nestes genes recapitulariam um estado mais ancestral de desenvolvimento (FALK *et al.*, 2007; JEAN *et al.*, 2020).

#### **I.4. Justificativa do estudo**

Dado o arcabouço teórico exposto, sumarizado na **Figura 5**, percebe-se como fundamental o estudo das bases celulares e moleculares da microcefalia, não apenas para auxiliar o diagnóstico genético de indivíduos acometidos por esta condição, como também para propiciar novas descobertas que ampliem a compreensão acerca do desenvolvimento e evolução do cérebro humano ( VON DER HAGEN *et al.*, 2014; ZAQOUT & KAINDL, 2021).

**Figura 5.** Síntese das bases teóricas do presente estudo.



As mudanças evolutivas no cérebro dos primatas e, mais especificamente, dos homínídeos, levou ao desenvolvimento das habilidades cognitivas típicas dos humanos modernos. No entanto, distúrbios no desenvolvimento do SNC podem resultar em condições clínicas como a microcefalia, caracterizada por uma notável heterogeneidade etiológica e fenotípica, e cuja manifestação rememora um estado cerebral mais ancestral. **Fonte:** esquema desenvolvido utilizando o *software BioRender.com*.

A epidemia recente da doença da Zika, por exemplo, especialmente relevante no Brasil e em outros países da América Latina entre 2015-2019, destacou a importância deste distúrbio em esfera nacional, tanto no âmbito social quanto acadêmico, atuando como um tópico crucial de estudos em neurociência (ZAQOUT & KAINDL, 2021).

Além disso, a epidemia evidenciou um dado recorrente da literatura: a grande proporção de casos idiopáticos de microcefalia. Um trabalho baseado nos dados do Ministério da Saúde, que atualizou a situação diagnóstica de nascidos vivos microcefálicos com suspeita de problemas de neurodesenvolvimento durante os dois anos iniciais da epidemia, revelou que foi potencialmente descartada a etiologia infecciosa para 50,3% dos casos (5.079 indivíduos), incluindo-se a testagem para Zika vírus, sífilis, toxoplasmose, rubéola e herpes (FRANÇA *et al.*, 2018). Embora outras causas ambientais não possam ser desconsideradas, a origem genética da condição deve ser apreciada, dada a sua relevância em termos de prognóstico, eventuais opções de tratamento e conduta clínica, além de importância no aconselhamento familiar (VON DER HAGEN *et al.*, 2014; VISSERS *et al.*, 2016).

A despeito da importância da etiologia genética na microcefalia, trabalhos com coortes maiores atingem uma taxa de diagnóstico molecular variável utilizando CMA e WES, entre 29-52% (VON DER HAGEN *et al.*, 2014; RUMP *et al.*, 2016; BOONSAWAT *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; DAWIDZIUK *et al.*, 2021; MASIH *et al.*, 2022). Estes dados trazem a expectativa de muitos *loci* e mecanismos etiológicos ainda não identificados com atuação relevante em neurodesenvolvimento, uma vez que considerando apenas casos de MCPH, variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em genes conhecidos não são detectadas em aproximadamente 62% de europeus ocidentais e norte-americanos e 25% de indianos e paquistaneses (ZAQOUT & KAINDL, 2021).

Tais conhecimentos, juntamente com a ausência de trabalhos na literatura científica explorando as bases genéticas da microcefalia síndrômica associada a NDD na população brasileira, levaram aos seguintes questionamentos que embasaram a realização deste estudo:

- a. Quais são os genes e alterações cromossômicas responsáveis pelo fenótipo em uma amostra de estudo da população brasileira?
- b. A taxa de diagnóstico molecular, utilizando microarranjo genômico e sequenciamento de exoma completo, é similar na população brasileira à descrita por outros estudos em coortes microcefálicas?

- c. A heterogeneidade genética e clínica do fenótipo em amostra da população brasileira, notável pela sua diversidade e miscigenação, é igual ou superior aos demais estudos?
- d. É possível identificar novos genes de neurodesenvolvimento em casos que permaneçam sem etiologia molecular elucidada?

## Resumo

---

O desenvolvimento embrionário do cérebro humano é intrincado e altamente coordenado espacial e temporalmente, o que é primordial para seu correto funcionamento, assim como foi no passado ao longo da evolução dos primatas. Distúrbios neste processo podem comprometer função e tamanho do órgão, como na microcefalia, uma condição clínica caracterizada pela redução do perímetro cefálico em pelo menos 2 desvios-padrão (SD) da média para aquela idade e sexo. A microcefalia pode ser classificada em congênita (primária) ou pós-natal, sendo considerada leve (-2 a -3 SD) ou grave ( $\leq -3$  SD); também pode ser classificada como sindrômica, se alterações externas ao sistema nervoso central estiverem presentes. Sua incidência é de 2-3% na população mundial e tem etiologias diversas, tanto ambiental quanto genética, com a maior parte dos casos permanecendo idiopática. Por se tratar de uma condição complexa que muitas vezes se apresenta associada a outros fenótipos, ainda há muito a ser explorado em relação às bases genéticas da microcefalia, previamente não investigadas na população brasileira. Este trabalho se propôs a avaliar uma coorte de indivíduos brasileiros afetados por microcefalia associada a distúrbios de neurodesenvolvimento, visando caracterizar as bases genéticas do fenótipo e quadros clínicos associados. Para tanto, realizamos análise cromossômica por microarranjo genômico (CMA) para investigação de alterações de número de cópias (CNVs), bem como sequenciamento de exoma completo (WES) para prospecção de variantes genômicas pontuais em um subgrupo de pacientes. No estudo por CMA, analisamos 185 pacientes microcefálicos, dos quais 39 tinham CNVs clinicamente relevantes. Compilamos uma lista inédita de genes reconhecidos como causa de microcefalia e realizamos o levantamento das síndromes de CNVs associadas. Neste estudo de CNVs raras causais, sugerimos novos genes candidatos para o fenótipo com base na caracterização das regiões afetadas no grupo avaliado de pacientes, assim como em pacientes microcefálicos descritos no banco de dados DECIPHER: genes reconhecidamente associados à microcefalia por SNVs e indels, mas não ainda por CNVs; aqueles com evidência ainda insuficiente para corroborar tal associação; genes conhecidos de macrocefalia; e novos candidatos, propostos no presente estudo, como *OTUD7A*, *BBC3*, *CNTN6* e *NAA15*. No estudo por WES, investigamos 45 indivíduos (42 famílias) que tiveram resultado negativo no CMA (100 exomas analisados no total), resultando em uma taxa de diagnóstico molecular (variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas) de 47,6%, similar à reportada na literatura. Em relação à

apresentação clínica, deficiência intelectual e alterações cerebrais estruturais foram altamente prevalentes, com taxas similares a outras coortes de microcefalia, mas encontramos frequências superiores de dismorfismos faciais, alterações comportamentais, cardiovasculares e musculoesqueléticas, além de perda auditiva. Pela análise dos casos negativos no CMA e exoma, identificamos um gene novo causativo para o fenótipo (*CCDC17*), que requer estudos funcionais futuros para validação. Em conclusão, contribuímos para o diagnóstico molecular e aconselhamento genético de metade de um total de 48 famílias (no mínimo um indivíduo com microcefalia dentre seus sinais clínicos). Em seis casos, foram identificadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas do tipo CNV, e em 20 casos foram detectadas variantes do tipo SNV/indel (taxa de diagnóstico molecular global de 54,2%). Estes achados corroboram a microcefalia como um importante indicador de alterações genômicas e evidenciam que o exoma como primeira linha de investigação seria a melhor estratégia para diagnóstico desta condição. Adicionalmente, trouxemos uma visão inédita das causas genéticas da condição na população brasileira e das comorbidades mais frequentes, bem como pudemos sugerir novos genes candidatos ao fenótipo que poderão ser explorados em pesquisas futuras. Ainda assim, aproximadamente metade dos casos avaliados permanece idiopático, apontando para a necessidade de estratégias complementares de investigação de alterações estruturais e não-codificadoras, baseadas em tecnologias como sequenciamento de genoma completo, sequenciamento de moléculas longas, mapeamento ótico, estudos epigenéticos e investigação de alterações mitocondriais.

## *Abstract*

---

The embryonic development of the human brain is intricate and spatially and temporally highly coordinated, which is essential for its proper performance, as it was in the past throughout the evolution of primates. Disturbances in this process can compromise the organ function and size, as occurs in microcephaly. It is a clinical condition characterized by reduction of the occipitofrontal circumference by at least 2 standard deviations (SD) from the mean for that age and sex. Microcephaly can be congenital (primary) or postnatal, considered mild (-2 to -3 SD) or severe ( $\leq -3$  SD); it can also be classified as syndromic if alterations external to the central nervous system are present. Its incidence is 2-3% in the world population and has various etiologies, environmental and genetic, with most cases remaining idiopathic. Because it is a complex condition often associated with other phenotypes, there is still much to be explored about the genetic bases of microcephaly, previously not investigated in the Brazilian population. This work aimed to evaluate a cohort of Brazilian individuals affected by microcephaly associated with neurodevelopmental disorders, aiming to characterize the genetic bases of the phenotype, and associated clinical conditions. To this end, we performed chromosomal microarray analysis (CMA) to investigate copy number variants (CNVs), and, in a subgroup of patients, whole-exome sequencing (WES) to prospect for specific genomic variants. In the CMA study, we analyzed 185 microcephalic patients, of whom 39 had clinically relevant CNVs. We compiled a list of recognized microcephaly genes and surveyed associated CNV syndromes. In this study of rare causal CNVs, we suggested new candidate genes for the phenotype based on the characterization of the affected regions in the evaluated group of patients, as well as evaluating microcephalic patients reported in the DECIPHER database: genes known to be associated with microcephaly by SNVs and indels, but not yet by CNVs; those with insufficient evidence to corroborate such an association; known macrocephaly genes; and new candidates, such as *OTUD7A*, *BBC3*, *CNTN6*, and *NAA15*. In the WES study, we investigated 45 individuals (42 families) who tested negative for CMA (100 exomes analyzed in total), resulting in a molecular diagnosis rate (pathogenic or likely pathogenic variants) of 47.6%, similar to the yield reported in WES studies from the literature. Regarding the clinical presentation, intellectual disability, and structural brain alterations were highly prevalent, with rates similar to other cohorts of microcephaly, but we found higher frequencies of facial dysmorphisms, behavioral, cardiovascular, and musculoskeletal alterations, in

addition to hearing loss. By analyzing the negative cases after CMA and exome analysis, we identified a novel gene for the microcephaly (*CCDC17*), which requires future functional studies for validation. In conclusion, we contributed to the molecular diagnosis and genetic counseling of half of a total of 48 families with at least one individual with microcephaly among its clinical signs. In six cases, pathogenic or probably pathogenic CNV variants were identified, and in 20 cases SNV/indel variants were detected (overall molecular diagnosis rate 54.2%). These findings have corroborated that microcephaly is an important indicator of genomic alterations and showed that using exome as the first-tier of investigation would be the best strategy for diagnosing this condition. Additionally, we brought an unprecedented view of the genetic causes of microcephaly in a Brazilian population, and the most frequent comorbidities, as well as suggested new candidate genes that could be explored in future research. Even so, approximately half of the evaluated cases remain idiopathic, pointing to the need for complementary strategies for the investigation of structural and non-coding variants, based on technologies such as whole-genome sequencing, sequencing of long reads, optical mapping, epigenetic studies, and investigation of mitochondrial variants.



## Referências Bibliográficas

---

100,000 GENOMES PROJECT PILOT INVESTIGATORS; SMEDLEY, D.; SMITH, K. R.; MARTIN, A.; THOMAS, E. A.; MCDONAGH, E. M.; CIPRIANI, V.; ELLINGFORD, J. M.; ARNO, G.; TUCCI, A.; VANDROVCOVA, J.; CHAN, G.; WILLIAMS, H. J.; RATNAIKE, T.; WEI, W.; STIRRUPS, K.; IBANEZ, K.; MOUTSIANAS, L.; WIELSCHER, M.; NEED, A.; BARNES, M. R.; VESTITO, L.; BUCHANAN, J.; WORDSWORTH, S.; ASHFORD, S.; REHMSTRÖM, K.; LI, E.; FULLER, G.; TWISS, P.; SPASIC-BOSKOVIC, O.; HALSALL, S.; FLOTO, R. A.; POOLE, K.; WAGNER, A.; MEHTA, S. G.; GURNELL, M.; BURROWS, N.; JAMES, R.; PENKETT, C.; DEWHURST, E.; GRÄF, S.; MAPETA, R.; KASANICKI, M.; HAWORTH, A.; SAVAGE, H.; BABCOCK, M.; REESE, M. G.; BALE, M.; BAPLE, E.; BOUSTRED, C.; BRITAIN, H.; DE BURCA, A.; BLEDA, M.; DEVEREAU, A.; HALAI, D.; HARALDSDOTTIR, E.; HYDER, Z.; KASPERAVICIUTE, D.; PATCH, C.; POLYCHRONOPOULOS, D.; MATCHAN, A.; SULTANA, R.; RYTEN, M.; TAVARES, A. L. T.; TREGIDGO, C.; TURNBULL, C.; WELLAND, M.; WOOD, S.; SNOW, C.; WILLIAMS, E.; LEIGH, S.; FOULGER, R. E.; DAUGHERTY, L. C.; NIBLOCK, O.; LEONG, I. U. S.; WRIGHT, C. F.; DAVIES, J.; CRICHTON, C.; WELCH, J.; WOODS, K.; ABULHOUL, L.; AURORA, P.; BOCKENHAUER, D.; BROOMFIELD, A.; CLEARY, M. A.; LAM, T.; DATTANI, M.; FOOTITT, E.; GANESAN, V.; GRUNEWALD, S.; COMPEYROT-LACASSAGNE, S.; MUNTONI, F.; PILKINGTON, C.; QUINLIVAN, R.; THAPAR, N.; WALLIS, C.; WEDDERBURN, L. R.; WORTH, A.; BUESER, T.; COMPTON, C.; DESHPANDE, C.; FASSIHI, H.; HAQUE, E.; IZATT, L.; JOSIFOVA, D.; MOHAMMED, S.; ROBERT, L.; ROSE, S.; RUDDY, D.; SARKANY, R.; SAY, G.; SHAW, A. C.; WOLEJKO, A.; HABIB, B.; BURNS, G.; HUNTER, S.; GROCOCK, R. J.; HUMPHRAY, S. J.; ROBINSON, P. N.; HAENDEL, M.; SIMPSON, M. A.; BANKA, S.; CLAYTON-SMITH, J.; DOUZGOU, S.; HALL, G.; THOMAS, H. B.; O'KEEFE, R. T.; MICHAELIDES, M.; MOORE, A. T.; MALKA, S.; PONTIKOS, N.; BROWNING, A. C.; STRAUB, V.; GORMAN, G. S.; HORVATH, R.; QUINTON, R.; SCHAEFER, A. M.; YU-WAI-MAN, P.; TURNBULL, D. M.; MCFARLAND, R.; TAYLOR, R. W.; O'CONNOR, E.; YIP, J.; NEWLAND, K.; MORRIS, H. R.; POLKE, J.; WOOD, N. W.; CAMPBELL, C.; CAMPS, C.; GIBSON, K.; KOELLING, N.; LESTER, T.; NÉMETH, A. H.; PALLES, C.; PATEL, S.; ROY, N. B. A.; SEN, A.; TAYLOR, J.; CACHEIRO, P.; JACOBSEN, J. O.; SEABY, E. G.; DAVISON, V.; CHITTY, L.; DOUGLAS, A.; NARESH, K.; MCMULLAN, D.; ELLARD, S.; TEMPLE, I. K.; MUMFORD, A. D.; WILSON, G.; BEALES, P.; BITNER-GLINDZICZ, M.; BLACK, G.; BRADLEY, J. R.; BRENNAN, P.; BURN, J.; CHINNERY, P. F.; ELLIOTT, P.; FLINTER, F.; HOULDEN, H.; IRVING, M.; NEWMAN, W.; RAHMAN, S.; SAYER, J. A.; TAYLOR, J. C.; WEBSTER, A. R.; WILKIE, A. O. M.; OUWEHAND, W. H.; RAYMOND, F. L.; CHISHOLM, J.; HILL, S.; BENTLEY, D.; SCOTT, R. H.; FOWLER, T.; RENDON, A.; CAULFIELD, M. 100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care - Preliminary Report. *The New England Journal of Medicine*, v. 385, n. 20, p. 1868–1880, 11 nov. 2021.

ABUELO, D. Microcephaly Syndromes. *Seminars in Pediatric Neurology*, v. 14, n. 3, p. 118–127, set. 2007.

ALCANTARA, D.; O'DRISCOLL, M. Congenital Microcephaly. **American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics**, v. 166C, n. 2, p. 124–139, jun. 2014.

ASHWAL, S.; MICHELSON, D.; PLAWNER, L.; DOBYNS, W. B. Practice Parameter: Evaluation of the Child with Microcephaly (an Evidence-Based Review) [RETIRED]: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 73, n. 11, p. 887–897, 15 set. 2009.

BASTOS, G. C.; TOLEZANO, G. C.; KREPISCHI, A. C. V. Rare CNVs and Known Genes Linked to Macrocephaly: Review of Genomic Loci and Promising Candidate Genes. **Genes**, v. 13, n. 12, p. 2285, 4 dez. 2022.

BELGACEM, Y. H.; HAMILTON, A. M.; SHIM, S.; SPENCER, K. A.; BORODINSKY, L. N. The Many Hats of Sonic Hedgehog Signaling in Nervous System Development and Disease. **Journal of Developmental Biology**, v. 4, n. 4, p. 35, 10 dez. 2016.

BOLDUC, F. V.; SHEVELL, M. I. Corrected Head Circumference Centiles as a Possible Predictor of Developmental Performance in High-Risk Neonatal Intensive Care Unit Survivors. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 47, n. 11, p. 766–770, nov. 2005.

BOONSAWAT, P.; JOSET, P.; STEINDL, K.; ONEDA, B.; GOGOLL, L.; AZZARELLO-BURRI, S.; SHETH, F.; DATAR, C.; VERMA, I. C.; PURI, R. D.; ZOLLINO, M.; BACHMANN-GAGESCU, R.; NIEDRIST, D.; PAPIK, M.; FIGUEIRO-SILVA, J.; MASOOD, R.; ZWEIER, M.; KRAEMER, D.; LINCOLN, S.; RODAN, L.; PASSEMARD, S.; DRUNAT, S.; VERLOES, A.; HORN, A. H. C.; STICHT, H.; STEINFELD, R.; PLECKO, B.; LATAL, B.; JENNI, O.; ASADOLLAHI, R.; RAUCH, A. Elucidation of the Phenotypic Spectrum and Genetic Landscape in Primary and Secondary Microcephaly. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 9, p. 2043–2058, set. 2019.

BOYCOTT, K. M.; RATH, A.; CHONG, J. X.; HARTLEY, T.; ALKURAYA, F. S.; BAYNAM, G.; BROOKES, A. J.; BRUDNO, M.; CARRACEDO, A.; DEN DUNNEN, J. T.; DYKE, S. O. M.; ESTIVILL, X.; GOLDBLATT, J.; GONTHIER, C.; GROFT, S. C.; GUT, I.; HAMOSH, A.; HIETER, P.; HÖHN, S.; HURLES, M. E.; KAUFMANN, P.; KNOPPERS, B. M.; KRISCHER, J. P.; MACEK, M.; MATTHIJS, G.; OLRYS, A.; PARKER, S.; PASCHALL, J.; PHILIPPAKIS, A. A.; REHM, H. L.; ROBINSON, P. N.; SHAM, P.-C.; STEFANOV, R.; TARUSCIO, D.; UNNI, D.; VANSTONE, M. R.; ZHANG, F.; BRUNNER, H.; BAMSHAD, M. J.; LOCHMÜLLER, H. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. **American Journal of Human Genetics**, v. 100, n. 5, p. 695–705, 4 maio 2017.

BRONNER, M.; HATTEN, M. E. Chapter 15 - Neurogenesis and Migration. *Em*: SQUIRE, L. R.; BERG, D.; BLOOM, F. E.; DU LAC, S.; GHOSH, A.; SPITZER, N. C. **Fundamental Neuroscience (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 339–361.

CAPKOVA, Z.; CAPKOVA, P.; SROVNAL, J.; STAFFOVA, K.; BECVAROVA, V.; TRKOVA, M.; ADAMOVA, K.; SANTAVA, A.; CURTISOVA, V.; HAJDUCH, M.; PROCHAZKA, M. Differences in the Importance of Microcephaly, Dysmorphism, and

Epilepsy in the Detection of Pathogenic CNVs in ID and ASD Patients. **PeerJ**, v. 7, p. e7979, 2019.

CARVALHAL, S.; BADER, I.; ROOIMANS, M. A.; OOSTRA, A. B.; BALK, J. A.; FEICHTINGER, R. G.; BEICHLER, C.; SPEICHER, M. R.; VAN HAGEN, J. M.; WAISFISZ, Q.; VAN HAELST, M.; BRUIJN, M.; TAVARES, A.; MAYR, J. A.; WOLTHUIS, R. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; DE LANGE, J. Biallelic BUB1 Mutations Cause Microcephaly, Developmental Delay, and Variable Effects on Cohesion and Chromosome Segregation. **Science Advances**, v. 8, n. 3, p. eabk0114, 21 jan. 2022.

CHAVES, T. F.; OLIVEIRA, L. F.; OCAMPOS, M.; BARBATO, I. T.; DE LUCA, G. R.; BARBATO FILHO, J. H.; DE CAMARGO PINTO, L. L.; BERNARDI, P.; MARIS, A. F. Long Contiguous Stretches of Homozygosity Detected by Chromosomal Microarrays (CMA) in Patients with Neurodevelopmental Disorders in the South of Brazil. **BMC Medical Genomics**, v. 12, n. 1, p. 50, 12 mar. 2019.

CHEN, G.-L.; ZHEN, L.; LI, D.-Z. Prenatal Microcephaly: Exome Sequencing Aids Rapid Determination of Causative Etiologies. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 272, p. 259–261, maio 2022.

CHIURAZZI, P.; PIROZZI, F. Advances in Understanding - Genetic Basis of Intellectual Disability. **F1000Research**, v. 5, p. F1000 Faculty Rev-599, 2016.

CLARK, M. M.; STARK, Z.; FARNAES, L.; TAN, T. Y.; WHITE, S. M.; DIMMOCK, D.; KINGSMORE, S. F. Meta-Analysis of the Diagnostic and Clinical Utility of Genome and Exome Sequencing and Chromosomal Microarray in Children with Suspected Genetic Diseases. **NPJ Genomic Medicine**, v. 3, p. 16, 2018.

COLLINS, R. L.; GLESSNER, J. T.; PORCU, E.; LEPAMETS, M.; BRANDON, R.; LAURICELLA, C.; HAN, L.; MORLEY, T.; NIESTROJ, L.-M.; ULIRSCH, J.; EVERETT, S.; HOWRIGAN, D. P.; BOONE, P. M.; FU, J.; KARCZEWSKI, K. J.; KELLARIS, G.; LOWTHER, C.; LUCENTE, D.; MOHAJERI, K.; NŌUKAS, M.; NUTTLE, X.; SAMOCHA, K. E.; TRINH, M.; ULLAH, F.; VŌSA, U.; METSPALU, A.; MÄGI, R.; NELIS, M.; MILANI, L.; ESKO, T.; HURLES, M. E.; ARADHYA, S.; DAVIS, E. E.; FINUCANE, H.; GUSELLA, J. F.; JANZE, A.; KATSANIS, N.; MATYAKHINA, L.; NEALE, B. M.; SANDERS, D.; WARREN, S.; HODGE, J. C.; LAL, D.; RUDERFER, D. M.; MECK, J.; MÄGI, R.; ESKO, T.; REYMOND, A.; KUTALIK, Z.; HAKONARSON, H.; SUNYAEV, S.; BRAND, H.; TALKOWSKI, M. E. A Cross-Disorder Dosage Sensitivity Map of the Human Genome. **Cell**, v. 185, n. 16, p. 3041- 3055.e25, 4 ago. 2022.

COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S.; ROSENFELD, J. A.; VU, T. H.; BAKER, C.; WILLIAMS, C.; STALKER, H.; HAMID, R.; HANNIG, V.; ABDEL-HAMID, H.; BADER, P.; MCCRACKEN, E.; NIYAZOV, D.; LEPPIG, K.; THIESE, H.; HUMMEL, M.; ALEXANDER, N.; GORSKI, J.; KUSSMANN, J.; SHASHI, V.; JOHNSON, K.; REHDER, C.; BALLIF, B. C.; SHAFFER, L. G.; EICHLER, E. E. A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay. **Nature Genetics**, v. 43, n. 9, p. 838–846, 14 ago. 2011.

CUSTOM CGH AND CGH+SNP CONTENT AT YOUR FINGER TIPS. **Agilent**. Disponível em: <<https://www.agilent.com/en/promotions/custom-cgh>>. Acesso em: jan. 2023.

DAWIDZIUK, M.; GAMBIN, T.; BUKOWSKA-OLECH, E.; ANTCZAK-MARACH, D.; BADURA-STRONKA, M.; BUDA, P.; BUDZYNSKA, E.; CASTANEDA, J.; CHILARSKA, T.; CZYZYK, E.; ECKERSDORF-MASTALERZ, A.; FIJAK-MOSKAL, J.; GIERUSZCZAK-BIALEK, D.; GLODEK-BRZOZOWSKA, E.; GOSZCZANSKA-CIUCHTA, A.; GRZESZYKOWSKA-PODYMNIAK, M.; GURDA, B.; JAKUBIUK-TOMASZUK, A.; JAMROZ, E.; JANECZKO, M.; JEDLIŃSKA-PIJANOWSKA, D.; JUREK, M.; KAROLEWSKA, D.; KAZMIERCZAK, A.; KLEIST, T.; KOCHANOWSKA, I.; KRAJEWSKA-WALASEK, M.; KUFEL, K.; KUTKOWSKA-KAŻMIERCZAK, A.; LIPIEC, A.; MAKSYM-GASIOREK, D.; MATERNA-KIRYLUK, A.; MAZURKIEWICZ, H.; MILEWSKI, M.; PAVINA-GUGLAS, T.; PIETRZYK, A.; POSMYK, R.; PYRKOSZ, A.; RUDZKA-DYBALA, M.; SLEZAK, R.; WISNIEWSKA, M.; ZALEWSKA-MISZKURKA, Z.; SZCZEPANIK, E.; OBERSZTYN, E.; BEKIESINSKA-FIGATOWSKA, M.; GAWLINSKI, P.; WISZNIEWSKI, W. Exome Sequencing Reveals Novel Variants and Expands the Genetic Landscape for Congenital Microcephaly. **Genes**, v. 12, n. 12, p. 2014, 18 dez. 2021.

DEVAKUMAR, D.; BAMFORD, A.; FERREIRA, M. U.; BROAD, J.; ROSCH, R. E.; GROCE, N.; BREUER, J.; CARDOSO, M. A.; COPP, A. J.; ALEXANDRE, P.; RODRIGUES, L. C.; ABUBAKAR, I. Infectious Causes of Microcephaly: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. e1–e13, jan. 2018.

DEVHARE, P.; MEYER, K.; STEELE, R.; RAY, R. B.; RAY, R. Zika Virus Infection Dysregulates Human Neural Stem Cell Growth and Inhibits Differentiation into Neuroprogenitor Cells. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3106, 12 out. 2017.

DICKE, U.; ROTH, G. Neuronal Factors Determining High Intelligence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1685, p. 20150180, 5 jan. 2016.

DOLK, H. The Predictive Value of Microcephaly during the First Year of Life for Mental Retardation at Seven Years. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 33, n. 11, p. 974–983, nov. 1991.

DUERINCKX, S.; DÉsir, J.; PERAZZOLO, C.; BADOER, C.; JACQUEMIN, V.; SOBLET, J.; MAYSTADT, I.; TUNCA, Y.; BLAUMEISER, B.; CEULEMANS, B.; COURTENS, W.; DEBRAY, F.-G.; DESTREE, A.; DEVRIENDT, K.; JANSEN, A.; KEYMOLEN, K.; LEDERER, D.; LOEYS, B.; MEUWISSEN, M.; MOORTGAT, S.; MORTIER, G.; NASSOGNE, M.-C.; SEKHARA, T.; VAN COSTER, R.; VAN DEN ENDE, J.; VAN DER AA, N.; VAN ESCH, H.; VANAKKER, O.; VERHELST, H.; VILAIN, C.; WECKHUYSEN, S.; PASSEMARD, S.; VERLOES, A.; AEBY, A.; DECONINCK, N.; VAN BOGAERT, P.; PIRSON, I.; ABRAMOWICZ, M. Phenotypes and Genotypes in Non-Consanguineous and Consanguineous Primary Microcephaly: High Incidence of Epilepsy. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 9, n. 9, p. e1768, set. 2021.

DUERINCKX, S.; JACQUEMIN, V.; DRUNAT, S.; VIAL, Y.; PASSEMARD, S.; PERAZZOLO, C.; MASSART, A.; SOBLET, J.; RACAPÉ, J.; DESMYTER, L.; BADOER, C.; PAPADIMITRIOU, S.; LE BORGNE, Y.-A.; LEFORT, A.; LIBERT, F.; DE MAERTELAER, V.; ROOMAN, M.; COSTAGLIOLA, S.; VERLOES, A.; LENAERTS, T.;

- PIRSON, I.; ABRAMOWICZ, M. Digenic Inheritance of Human Primary Microcephaly Delineates Centrosomal and Non-Centrosomal Pathways. **Human Mutation**, v. 41, n. 2, p. 512–524, fev. 2020.
- FAHEEM, M.; NASEER, M. I.; RASOOL, M.; CHAUDHARY, A. G.; KUMOSANI, T. A.; ILYAS, A. M.; PUSHPARAJ, P.; AHMED, F.; ALGAHTANI, H. A.; AL-QAHTANI, M. H.; SALEH JAMAL, H. Molecular Genetics of Human Primary Microcephaly: An Overview. **BMC Medical Genomics**, v. 8 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S4, 2015.
- FALK, D.; HILDEBOLT, C.; SMITH, K.; MORWOOD, M. J.; SUTIKNA, T.; JATMIKO, null; SAPTOMO, E. W.; IMHOF, H.; SEIDLER, H.; PRIOR, F. Brain Shape in Human Microcephalics and Homo Floresiensis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2513–2518, 13 fev. 2007.
- FAROOQ, M.; LINDBÆK, L.; KROGH, N.; DOGANLI, C.; KELLER, C.; MÖNNICH, M.; GONÇALVES, A. B.; SAKTHIVEL, S.; MANG, Y.; FATIMA, A.; ANDERSEN, V. S.; HUSSAIN, M. S.; EIBERG, H.; HANSEN, L.; KJAER, K. W.; GOPALAKRISHNAN, J.; PEDERSEN, L. B.; MØLLGÅRD, K.; NIELSEN, H.; BAIG, S. M.; TOMMERUP, N.; CHRISTENSEN, S. T.; LARSEN, L. A. RRP7A Links Primary Microcephaly to Dysfunction of Ribosome Biogenesis, Resorption of Primary Cilia, and Neurogenesis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5816, 16 nov. 2020.
- FERREIRA, C. R. The Burden of Rare Diseases. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 179, n. 6, p. 885–892, jun. 2019.
- FRANÇA, G. V. A. de; PEDI, V. D.; GARCIA, M. H. de O.; CARMO, G. M. I. do; LEAL, M. B.; GARCIA, L. P.; FRANÇA, G. V. A. de; PEDI, V. D.; GARCIA, M. H. de O.; CARMO, G. M. I. do; LEAL, M. B.; GARCIA, L. P. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em nascidos vivos no Brasil: descrição da distribuição dos casos notificados e confirmados em 2015-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 2, jun. 2018.
- GAO, C.; WANG, X.; MEI, S.; LI, D.; DUAN, J.; ZHANG, P.; CHEN, B.; HAN, L.; GAO, Y.; YANG, Z.; LI, B.; YANG, X.-A. Diagnostic Yields of Trio-WES Accompanied by CNVseq for Rare Neurodevelopmental Disorders. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 485, 24 maio 2019.
- GILMORE, E. C.; WALSH, C. A. Genetic Causes of Microcephaly and Lessons for Neuronal Development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 2, n. 4, p. 461–478, jul. 2013.
- GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The Cell Biology of Neurogenesis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 10, p. 777–788, out. 2005.
- GUISSART, C.; LATYPOVA, X.; ROLLIER, P.; KHAN, T. N.; STAMBERGER, H.; MCWALTER, K.; CHO, M. T.; KJAERGAARD, S.; WECKHUYSEN, S.; LESCA, G.; BESNARD, T.; ÖUNAP, K.; SCHEMA, L.; CHIOCCHETTI, A. G.; MCDONALD, M.; DE BELLESCIZE, J.; VINCENT, M.; VAN ESCH, H.; SATTLER, S.; FORGHANI, I.; THIFFAULT, I.; FREITAG, C. M.; BARBOUTH, D. S.; CADIEUX-DION, M.; WILLAERT, R.; GUILLEN SACOTO, M. J.; SAFINA, N. P.; DUBOURG, C.; GROTE, L.; CARRÉ, W.; SAUNDERS, C.; PAJUSALU, S.; FARROW, E.; BOLAND, A.;

KARLOWICZ, D. H.; DELEUZE, J.-F.; WOJCIK, M. H.; PRESSMAN, R.; ISIDOR, B.; VOGELS, A.; VAN PAESSCHEN, W.; AL-GAZALI, L.; AL SHAMSI, A. M.; CLAUSTRES, M.; PUJOL, A.; SANDERS, S. J.; RIVIER, F.; LÉBOUCQ, N.; COGNÉ, B.; SASORITH, S.; SANLAVILLE, D.; RETTERER, K.; ODENT, S.; KATSANIS, N.; BÉZIEAU, S.; KOENIG, M.; DAVIS, E. E.; PASQUIER, L.; KÜRY, S. Dual Molecular Effects of Dominant RORA Mutations Cause Two Variants of Syndromic Intellectual Disability with Either Autism or Cerebellar Ataxia. **American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 5, p. 744–759, 3 maio 2018.

HANZLIK, E.; GIGANTE, J. Microcephaly. **Children (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 6, p. 47, 9 jun. 2017.

HARRIS, S. R. Measuring Head Circumference: Update on Infant Microcephaly. **Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien**, v. 61, n. 8, p. 680–684, ago. 2015.

HENDERSON, L. B.; APPLGATE, C. D.; WOHLER, E.; SHERIDAN, M. B.; HOOVER-FONG, J.; BATISTA, D. A. S. The Impact of Chromosomal Microarray on Clinical Management: A Retrospective Analysis. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 9, p. 657–664, set. 2014.

HERCULANO-HOUZEL, S. The Remarkable, yet Not Extraordinary, Human Brain as a Scaled-up Primate Brain and Its Associated Cost. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. supplement\_1, p. 10661–10668, 26 jun. 2012.

HERCULANO-HOUZEL, S.; COLLINS, C. E.; WONG, P.; KAAS, J. H. Cellular Scaling Rules for Primate Brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3562–3567, 27 fev. 2007.

HIGGINS, J.; MIDGLEY, C.; BERGH, A.-M.; BELL, S. M.; ASKHAM, J. M.; ROBERTS, E.; BINNS, R. K.; SHARIF, S. M.; BENNETT, C.; GLOVER, D. M.; WOODS, C. G.; MORRISON, E. E.; BOND, J. Human ASPM Participates in Spindle Organisation, Spindle Orientation and Cytokinesis. **BMC Cell Biology**, v. 11, p. 85, 2 nov. 2010.

HOFMAN, M. A. Evolution of the Human Brain: When Bigger Is Better. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, p. 15, 2014.

ISKOW, R. C.; GOKCUMEN, O.; LEE, C. Exploring the role of copy number variants in human adaptation. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 6, p. 245–257, jun. 2012.

JANSEN, S.; VISSERS, L. E. L. M.; DE VRIES, B. B. A. The Genetics of Intellectual Disability. **Brain Sciences**, v. 13, n. 2, p. 231, fev. 2023.

JEAN, F.; STUART, A.; TARAILO-GRAOVAC, M. Dissecting the Genetic and Etiological Causes of Primary Microcephaly. **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 570830, 2020.

KAAS, J. H. Neocortex in Early Mammals and Its Subsequent Variations: Kaas. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1225, n. 1, p. 28–36, abr. 2011.

KAAS, J. H. The Origin and Evolution of Neocortex: From Early Mammals to Modern Humans. **Progress in Brain Research**, v. 250, p. 61–81, 2019.

KAHRIZI, K.; HU, H.; HOSSEINI, M.; KALSCHEUER, V. M.; FATTAHI, Z.; BEHESHTIAN, M.; SUCKOW, V.; MOHSENI, M.; LIPKOWITZ, B.; MEHVARI, S.; MEHRJOO, Z.; AKHTARKHAVARI, T.; GHADERI, Z.; RAHIMI, M.; ARZHANGI, S.; JAMALI, P.; FALAHAT CHIAN, M.; NIKUEI, P.; SABBAGH KERMANI, F.; SADEGHINIA, F.; JAZAYERI, R.; TONEKABONI, S. H.; KHOSHAEEN, A.; HABIBI, H.; POURFATEMI, F.; MOJAHEDI, F.; KHODAIE-ARDAKANI, M.-R.; NAJAFIPOUR, R.; WIENKER, T. F.; NAJMABADI, H.; ROPERS, H.-H. Effect of Inbreeding on Intellectual Disability Revisited by Trio Sequencing. **Clinical Genetics**, v. 95, n. 1, p. 151–159, jan. 2019.

KHAN, A.; ALAAMERY, M.; MASSADEH, S.; OBAID, A.; KASHGARI, A. A.; WALSH, C. A.; EYAAD, W. PDCD6IP, Encoding a Regulator of the ESCRT Complex, Is Mutated in Microcephaly. **Clinical Genetics**, v. 98, n. 1, p. 80–85, jul. 2020.

KINGDOM, R.; WRIGHT, C. F. Incomplete Penetrance and Variable Expressivity: From Clinical Studies to Population Cohorts. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 920390, 2022.

KREPISCHI, A. C. V.; VILLELA, D.; DA COSTA, S. S.; MAZZONETTO, P. C.; SCHAUREN, J.; MIGLIAVACCA, M. P.; MILANEZI, F.; SANTOS, J. G.; GUIDA, G.; GUARISCHI-SOUSA, R.; CAMPANA, G.; KOK, F.; SCHLESINGER, D.; KITAJIMA, J. P.; CAMPAGNARI, F.; BERTOLA, D. R.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEARSON, P. L.; ROSENBERG, C. Chromosomal Microarray Analyses from 5778 Patients with Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies in Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15184, 7 set. 2022.

KUIJPERS, M.; HOOGENRAAD, C. C. Centrosomes, Microtubules and Neuronal Development. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 48, n. 4, p. 349–358, dez. 2011.

LEE, J.; PARK, J. E.; LEE, C.; KIM, A. R.; KIM, B. J.; PARK, W.-Y.; KI, C.-S.; LEE, J. Genomic Analysis of Korean Patient With Microcephaly. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 543528, 2020.

LEK, M.; KARCZEWSKI, K. J.; MINIKEL, E. V.; SAMOCHA, K. E.; BANKS, E.; FENNELL, T.; O'DONNELL-LURIA, A. H.; WARE, J. S.; HILL, A. J.; CUMMINGS, B. B.; TUKIAINEN, T.; BIRNBAUM, D. P.; KOSMICKI, J. A.; DUNCAN, L. E.; ESTRADA, K.; ZHAO, F.; ZOU, J.; PIERCE-HOFFMAN, E.; BERGHOUT, J.; COOPER, D. N.; DEFLAUX, N.; DEPRISTO, M.; DO, R.; FLANNICK, J.; FROMER, M.; GAUTHIER, L.; GOLDSTEIN, J.; GUPTA, N.; HOWRIGAN, D.; KIEZUN, A.; KURKI, M. I.; MOONSHINE, A. L.; NATARAJAN, P.; OROZCO, L.; PELOSO, G. M.; POPLIN, R.; RIVAS, M. A.; RUANO-RUBIO, V.; ROSE, S. A.; RUDERFER, D. M.; SHAKIR, K.; STENSON, P. D.; STEVENS, C.; THOMAS, B. P.; TIAO, G.; TUSIE-LUNA, M. T.; WEISBURD, B.; WON, H.-H.; YU, D.; ALTSHULER, D. M.; ARDISSINO, D.; BOEHNKE, M.; DANESH, J.; DONNELLY, S.; ELOSUA, R.; FLOREZ, J. C.; GABRIEL, S. B.; GETZ, G.; GLATT, S. J.; HULTMAN, C. M.; KATHIRESAN, S.; LAAKSO, M.; MCCARROLL, S.; MCCARTHY, M. I.; MCGOVERN, D.; MCPHERSON, R.; NEALE, B. M.; PALOTIE, A.; PURCELL, S. M.; SALEHEEN, D.; SCHARF, J. M.; SKLAR, P.; SULLIVAN, P. F.; TUOMILEHTO, J.; TSUANG, M. T.; WATKINS, H. C.; WILSON, J. G.; DALY, M. J.; MACARTHUR, D. G. Analysis of Protein-Coding Genetic Variation in 60,706 Humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285–291, ago. 2016.

LOGSDON, G. A.; VOLLGER, M. R.; EICHLER, E. E. Long-Read Human Genome Sequencing and Its Applications. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 10, p. 597–614, out. 2020.

MANTERE, T.; NEVELING, K.; PEBREL-RICHARD, C.; BENOIST, M.; VAN DER ZANDE, G.; KATER-BAATS, E.; BAATOUT, I.; VAN BEEK, R.; YAMMINE, T.; OORSPRONG, M.; HSOUMI, F.; OLDE-WEGHUIS, D.; MAJDALI, W.; VERMEULEN, S.; PAUPER, M.; LEBBAR, A.; STEVENS-KROEF, M.; SANLAVILLE, D.; DUPONT, J. M.; SMEETS, D.; HOISCHEN, A.; SCHLUTH-BOLARD, C.; EL KHATTABI, L. Optical Genome Mapping Enables Constitutional Chromosomal Aberration Detection. **American Journal of Human Genetics**, v. 108, n. 8, p. 1409–1422, 5 ago. 2021.

MASIH, S.; MOIRANGTHEM, A.; SHAMBHAVI, A.; RAI, A.; MANDAL, K.; SAXENA, D.; NILAY, M.; AGRAWAL, N.; SRIVASTAVA, S.; SAIT, H.; PHADKE, S. R. Deciphering the Molecular Landscape of Microcephaly in 87 Indian Families by Exome Sequencing. **European Journal of Medical Genetics**, v. 65, n. 6, p. 104520, jun. 2022.

MASSIMO, M.; LONG, K. R. Orchestrating Human Neocortex Development across the Scales; from Micro to Macro. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 130, p. 24–36, out. 2022.

MAULIK, P. K.; MASCARENHAS, M. N.; MATHERS, C. D.; DUA, T.; SAXENA, S. Prevalence of Intellectual Disability: A Meta-Analysis of Population-Based Studies. **Research in Developmental Disabilities**, v. 32, n. 2, p. 419–436, 2011.

MCMILLAN, H. J.; DAVILA, J.; OSMOND, M.; CHAKRABORTY, P.; CARE4RARE CANADA CONSORTIUM; BOYCOTT, K. M.; DYMENT, D. A.; KERNOHAN, K. D. Whole Genome Sequencing Identifies Pathogenic RNU4ATAC Variants in a Child with Recurrent Encephalitis, Microcephaly, and Normal Stature. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 185, n. 11, p. 3502–3506, nov. 2021.

MEDEIROS FIGUEIREDO, A.; SANCHEZ-VILLEGAS, P.; CRISTINA MOREIRA MARCULINO FIGUEIREDO, D.; SOUSA SOARES DE ARAUJO, J.; DAPONTE-CODINA, A. Microcephaly Epidemic in Brazil: An Earlier Chapter. **Infectious Diseases Now**, v. 51, n. 3, p. 260–265, maio 2021.

MEGRAW, T. L.; SHARKEY, J. T.; NOWAKOWSKI, R. S. Cdk5rap2 Exposes the Centrosomal Root of Microcephaly Syndromes. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 470–480, ago. 2011.

MEIENBERG, J.; BRUGGMANN, R.; OEXLE, K.; MATYAS, G. Clinical Sequencing: Is WGS the Better WES? **Human Genetics**, v. 135, n. 3, p. 359–362, mar. 2016.

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 Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with



Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749–764, 14 maio 2010.

MILLER, D. T.; LEE, K.; CHUNG, W. K.; GORDON, A. S.; HERMAN, G. E.; KLEIN, T. E.; STEWART, D. R.; AMENDOLA, L. M.; ADELMAN, K.; BALE, S. J.; GOLLOB, M. H.; HARRISON, S. M.; HERSHBERGER, R. E.; MCKELVEY, K.; RICHARDS, C. S.; VLANGOS, C. N.; WATSON, M. S.; MARTIN, C. L. ACMG SF v3.0 List for Reporting of Secondary Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing: A Policy Statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). **Genetics in Medicine**, v. 23, n. 8, p. 1381–1390, ago. 2021.

MOLNÁR, Z.; CLOWRY, G. J.; ŠESTAN, N.; ALZU'BI, A.; BAKKEN, T.; HEVNER, R. F.; HÜPPI, P. S.; KOSTOVIĆ, I.; RAKIC, P.; ANTON, E. S.; EDWARDS, D.; GARCEZ, P.; HOERDER-SUABEDISSEN, A.; KRIEGSTEIN, A. New Insights into the Development of the Human Cerebral Cortex. **Journal of Anatomy**, v. 235, n. 3, p. 432–451, set. 2019.

MOLNÁR, Z.; POLLEN, A. How Unique Is the Human Neocortex? **Development**, v. 141, n. 1, p. 11–16, 1 jan. 2014.

MONTGOMERY, S. H.; CAPELLINI, I.; VENDITTI, C.; BARTON, R. A.; MUNDY, N. I. Adaptive Evolution of Four Microcephaly Genes and the Evolution of Brain Size in Anthropoid Primates. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 625–638, jan. 2011.

MORA-BERMÚDEZ, F.; BADSHA, F.; KANTON, S.; CAMP, J. G.; VERNOT, B.; KÖHLER, K.; VOIGT, B.; OKITA, K.; MARICIC, T.; HE, Z.; LACHMANN, R.; PÄÄBO, S.; TREUTLEIN, B.; HUTTNER, W. B. Differences and Similarities between Human and Chimpanzee Neural Progenitors during Cerebral Cortex Development. **eLife**, v. 5, p. e18683, 26 set. 2016.

NASLAVSKY, M. S.; YAMAMOTO, G. L.; DE ALMEIDA, T. F.; EZQUINA, S. A. M.; SUNAGA, D. Y.; PHO, N.; BOZOKLIAN, D.; SANDBERG, T. O. M.; BRITO, L. A.; LAZAR, M.; BERNARDO, D. V.; AMARO, E.; DUARTE, Y. A. O.; LEBRÃO, M. L.; PASSOS-BUENO, M. R.; ZATZ, M. Exomic Variants of an Elderly Cohort of Brazilians in the ABraOM Database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, p. 751–763, jul. 2017.

NELLHAUS, G. Head Circumference from Birth to Eighteen Years. Practical Composite International and Interracial Graphs. **Pediatrics**, v. 41, n. 1, p. 106–114, jan. 1968.

NGUENGANG WAKAP, S.; LAMBERT, D. M.; OLRYS, A.; RODWELL, C.; GUEYDAN, C.; LANNEAU, V.; MURPHY, D.; LE CAM, Y.; RATH, A. Estimating Cumulative Point Prevalence of Rare Diseases: Analysis of the Orphanet Database. **European Journal of Human Genetics**, v. 28, n. 2, p. 165–173, fev. 2020.

NIEGO, A.; BENÍTEZ-BURRACO, A. Williams Syndrome, Human Self-Domestication, and Language Evolution. **Frontiers in Psychology**, v. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyg.2019.00521>>. Acesso em: 14 jun. 2023.

NIEMI, M. E. K.; MARTIN, H. C.; RICE, D. L.; GALLONE, G.; GORDON, S.; KELEMEN, M.; MCALONEY, K.; MCRAE, J.; RADFORD, E. J.; YU, S.; GECZ, J.; MARTIN, N. G.; WRIGHT, C. F.; FITZPATRICK, D. R.; FIRTH, H. V.; HURLES, M. E.;

- BARRETT, J. C. Common Genetic Variants Contribute to Risk of Rare Severe Neurodevelopmental Disorders. **Nature**, v. 562, n. 7726, p. 268–271, out. 2018.
- NUNEZ, C.; MORRIS, A.; HANSEN, M.; ELLIOTT, E. J. Microcephaly in Australian Infants: A Retrospective Audit. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 58, n. 3, p. 448–458, mar. 2022.
- OKAFOR, C.; KANEKAR, S. Imaging of Microcephaly. **Clinics in Perinatology**, v. 49, n. 3, p. 693–713, set. 2022.
- O'NEILL, R. S.; SCHOBORG, T. A.; RUSAN, N. M. Same but Different: Pleiotropy in Centrosome-Related Microcephaly. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 3, p. 241–246, 1 fev. 2018.
- PENISSON, M.; LADEWIG, J.; BELVINDRAH, R.; FRANCIS, F. Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 381, 2019.
- PINSON, A.; NAMBA, T.; HUTTNER, W. B. Malformations of Human Neocortex in Development – Their Progenitor Cell Basis and Experimental Model Systems. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 305, 9 jul. 2019.
- PIROZZI, F.; NELSON, B.; MIRZAA, G. From Microcephaly to Megalencephaly: Determinants of Brain Size. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 267–282, dez. 2018.
- POOLE, O. V.; PIZZAMIGLIO, C.; MURPHY, D.; FALABELLA, M.; MACKEN, W. L.; BUGIARDINI, E.; WOODWARD, C. E.; LABRUM, R.; EFTHYMIU, S.; SALPIETRO, V.; CHELBAN, V.; KAIYRZHANOV, R.; MAROOFIAN, R.; SYNAPS STUDY GROUP; AMATO, A. A.; GREGORY, A.; HAYFLICK, S. J.; QUEEN SQUARE GENOMICS; JONVIK, H.; WOOD, N.; HOULDEN, H.; VANDROVCOVA, J.; HANNA, M. G.; PITTMAN, A.; PITCEATHLY, R. D. S. Mitochondrial DNA Analysis from Exome Sequencing Data Improves Diagnostic Yield in Neurological Diseases. **Annals of Neurology**, v. 89, n. 6, p. 1240–1247, jun. 2021.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A.-S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. Formation of the Major Brain Subdivisions. **Neuroscience. 2nd edition**, 2001a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10954/>>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A.-S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. The Initial Formation of the Nervous System: Gastrulation and Neurulation. **Neuroscience. 2nd edition**, 2001b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10993/>>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- QUINTANS, M. D. S.; BUENO, A. C.; CARDOSO, C. A. A. Microcephaly Caused by or Associated with Congenital Infections in the Last 20 Years in Brazil: A Systematic Review. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 64, p. e7, 2022.
- RAKIC, P. Evolution of the Neocortex: A Perspective from Developmental Biology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 10, p. 724–735, out. 2009.

RAMOCKI, M. B.; ZOGHBI, H. Y. Failure of Neuronal Homeostasis Results in Common Neuropsychiatric Phenotypes. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 912–918, 16 out. 2008.

REE, R.; GEITHUS, A. S.; TØRRING, P. M.; SØRENSEN, K. P.; DAMKJÆR, M.; DDD STUDY; LYNCH, S. A.; ARNESEN, T. A Novel NAA10 p.(R83H) Variant with Impaired Acetyltransferase Activity Identified in Two Boys with ID and Microcephaly. **BMC Medical Genetics**, v. 20, n. 1, p. 101, 7 jun. 2019.

REPNIKOVA, E. A.; LYALIN, D. A.; MCDONALD, K.; ASTBURY, C.; HANSEN-KISS, E.; COOLEY, L. D.; PFAU, R.; HERMAN, G. E.; PYATT, R. E.; HICKEY, S. E. CNTN6 Copy Number Variations: Uncertain Clinical Significance in Individuals with Neurodevelopmental Disorders. **European Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 1, p. 103636, jan. 2020.

RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W. W.; HEGDE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K.; REHM, H. L. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, maio 2015.

RIGGS, E. R.; ANDERSEN, E. F.; CHERRY, A. M.; KANTARCI, S.; KEARNEY, H.; PATEL, A.; RACA, G.; RITTER, D. I.; SOUTH, S. T.; THORLAND, E. C.; PINEDA-ALVAREZ, D.; ARADHYA, S.; MARTIN, C. L. Technical Standards for the Interpretation and Reporting of Constitutional Copy-Number Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 2, p. 245–257, fev. 2020.

ROBINSON, B. V.; FAUNDEZ, V.; LERIT, D. A. Understanding Microcephaly through the Study of Centrosome Regulation in Drosophila Neural Stem Cells. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 5, p. 2101–2115, 30 out. 2020.

ROBINSON, P. N.; KÖHLER, S.; BAUER, S.; SEELow, D.; HORN, D.; MUNDLOS, S. The Human Phenotype Ontology: A Tool for Annotating and Analyzing Human Hereditary Disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 5, p. 610–615, nov. 2008.

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

RUMP, P.; JAZAYERI, O.; VAN DIJK-BOS, K. K.; JOHANSSON, L. F.; VAN ESSEN, A. J.; VERHEIJ, J. B. G. M.; VEENSTRA-KNOL, H. E.; REDEKER, E. J. W.; MANNENS, M. M. A. M.; SWERTZ, M. A.; ALIZADEH, B. Z.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. A.; SINKE, R. J.; SIKKEMA-RADDATZ, B. Whole-Exome Sequencing Is a Powerful Approach for Establishing the Etiological Diagnosis in Patients with Intellectual Disability and Microcephaly. **BMC Medical Genomics**, v. 9, p. 7, 4 fev. 2016.

SANTOS, S.; KOK, F.; WELLER, M.; DE PAIVA, F. R. L.; OTTO, P. A. Inbreeding levels in Northeast Brazil: Strategies for the prospecting of new genetic disorders. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 220–223, 2010.

SEABY, E. G.; ENNIS, S. Challenges in the Diagnosis and Discovery of Rare Genetic Disorders Using Contemporary Sequencing Technologies. **Briefings in Functional Genomics**, v. 19, n. 4, p. 243–258, 29 jul. 2020.

SHAHEEN, R.; MADDIREVULA, S.; EWIDA, N.; ALSAHLI, S.; ABDEL-SALAM, G. M. H.; ZAKI, M. S.; TALA, S. A.; ALHASHEM, A.; SOFTAH, A.; AL-OWAIN, M.; ALAZAMI, A. M.; ABADEL, B.; PATEL, N.; AL-SHEDDI, T.; ALOMAR, R.; ALOBEID, E.; IBRAHIM, N.; HASHEM, M.; ABDULWAHAB, F.; HAMAD, M.; TABARKI, B.; ALWADEI, A. H.; ALHAZZANI, F.; BASHIRI, F. A.; KENTAB, A.; ŞAHINTÜRK, S.; SHERR, E.; FREGEAU, B.; SOGATI, S.; ALSHAHWAN, S. A. M.; ALKHALIFI, S.; ALHUMAIDI, Z.; TEMTAMY, S.; AGLAN, M.; OTAIFY, G.; GIRISHA, K. M.; TULBAH, M.; SEIDAHMED, M. Z.; SALIH, M. A.; ABOUELHODA, M.; MOMIN, A. A.; SAFFAR, M. A.; PARTLOW, J. N.; AROLD, S. T.; FAQEIH, E.; WALSH, C.; ALKURAYA, F. S. Genomic and Phenotypic Delineation of Congenital Microcephaly. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 3, p. 545–552, mar. 2019.

SHAIKH, S. S.; NAHORSKI, M. S.; RAI, H.; WOODS, C. G. Before Progressing from “Exomes” to “Genomes”... Don’t Forget Splicing Variants. **European Journal of Human Genetics**, v. 26, n. 11, p. 1559–1562, nov. 2018.

SILBEREIS, J. C.; POCHAREDDY, S.; ZHU, Y.; LI, M.; SESTAN, N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. **Neuron**, v. 89, n. 2, p. 248–268, 20 jan. 2016.

SILVA, M.; DE LEEUW, N.; MANN, K.; SCHURING-BLOM, H.; MORGAN, S.; GIARDINO, D.; RACK, K.; HASTINGS, R. European Guidelines for Constitutional Cytogenomic Analysis. **European Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 1, p. 1–16, jan. 2019.

SISKOS, N.; STYLIANOPOULOU, E.; SKAVDIS, G.; GRIGORIOU, M. E. Molecular Genetics of Microcephaly Primary Hereditary: An Overview. **Brain Sciences**, v. 11, n. 5, p. 581, 30 abr. 2021.

SRIVASTAVA, S.; LOVE-NICHOLS, J. A.; DIES, K. A.; LEDBETTER, D. H.; MARTIN, C. L.; CHUNG, W. K.; FIRTH, H. V.; FRAZIER, T.; HANSEN, R. L.; PROCK, L.; BRUNNER, H.; HOANG, N.; SCHERER, S. W.; SAHIN, M.; MILLER, D. T.; NDD EXOME SCOPING REVIEW WORKGROUP. Meta-Analysis and Multidisciplinary Consensus Statement: Exome Sequencing Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Neurodevelopmental Disorders. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 2413–2421, nov. 2019.

TOLEZANO, G. C.; BASTOS, G. C.; DA COSTA, S. S.; FREIRE, B. L.; HOMMA, T. K.; HONJO, R. S.; YAMAMOTO, G. L.; PASSOS-BUENO, M. R.; KOIFFMANN, C. P.; KIM, C. A.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; DE LIMA JORGE, A. A.; BERTOLA, D. R.; ROSENBERG, C.; KREPISCHI, A. C. V. Burden of Rare Copy Number Variants in Microcephaly: A Brazilian Cohort of 185 Microcephalic Patients and Review of the Literature. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, 11 dez. 2022.

TOLEZANO, G. C.; COSTA, S. S. da; SCLiar, M. de O.; FERNANDES, W. L. M.; OTTO, P. A.; BERTOLA, D. R.; ROSENBERG, C.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; KREPISCHI, A. C. V. Investigating Genetic Factors Contributing to Variable Expressivity of Class I

17p13.3 Microduplications. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 9, n. 4, nov. 2020.

TRUEBESTEIN, L.; LEONARD, T. A. Coiled-Coils: The Long and Short of It. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 38, n. 9, p. 903–916, set. 2016.

UDDIN, M.; UNDA, B. K.; KWAN, V.; HOLZAPFEL, N. T.; WHITE, S. H.; CHALIL, L.; WOODBURY-SMITH, M.; HO, K. S.; HARWARD, E.; MURTAZA, N.; DAVE, B.; PELLECCIA, G.; D'ABATE, L.; NALPATHAMKALAM, T.; LAMOUREUX, S.; WEI, J.; SPEEVAK, M.; STAVROPOULOS, J.; HOPE, K. J.; DOBLE, B. W.; NIELSEN, J.; WASSMAN, E. R.; SCHERER, S. W.; SINGH, K. K. OTUD7A Regulates Neurodevelopmental Phenotypes in the 15q13.3 Microdeletion Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 2, p. 278–295, 1 fev. 2018.

VAN DER SANDEN, B. P. G. H.; SCHOBERS, G.; COROMINAS GALBANY, J.; KOOLEN, D. A.; SINNEMA, M.; VAN REEUWIJK, J.; STUMPEL, C. T. R. M.; KLEEFSTRA, T.; DE VRIES, B. B. A.; RUITERKAMP-VERSTEEG, M.; LEIJSTEN, N.; KWINT, M.; DERKS, R.; SWINKELS, H.; DEN OUDEN, A.; PFUNDT, R.; RINNE, T.; DE LEEUW, N.; STEGMANN, A. P.; STEVENS, S. J.; VAN DEN WIJNGAARD, A.; BRUNNER, H. G.; YNTEMA, H. G.; GILISSEN, C.; NELEN, M. R.; VISSERS, L. E. L. M. The Performance of Genome Sequencing as a First-Tier Test for Neurodevelopmental Disorders. **European Journal of Human Genetics**, v. 31, n. 1, p. 81–88, jan. 2023.

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, jan. 2016.

VON DER HAGEN, M.; PIVARCSI, M.; LIEBE, J.; VON BERNUTH, H.; DIDONATO, N.; HENNERMANN, J. B.; BÜHRER, C.; WIECZOREK, D.; KAINDL, A. M. Diagnostic Approach to Microcephaly in Childhood: A Two-Center Study and Review of the Literature. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 56, n. 8, p. 732–741, ago. 2014.

WILSCH-BRÄUNINGER, M.; HUTTNER, W. B. Primary Cilia and Centrosomes in Neocortex Development. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 755867, 2021.

WINNEPENNINCKX, B.; DEBACKER, K.; RAMSAY, J.; SMEETS, D.; SMITS, A.; FITZPATRICK, D. R.; KOOY, R. F. CGG-Repeat Expansion in the DIP2B Gene Is Associated with the Fragile Site FRA12A on Chromosome 12q13.1. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 2, p. 221–231, fev. 2007.

WOODS, C. G. Human Microcephaly. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 1, p. 112–117, fev. 2004.

WOODS, C. G.; BASTO, R. Microcephaly. **Current Biology**, v. 24, n. 23, p. R1109–1111, 1 dez. 2014.

WOODS, C. G.; PARKER, A. Investigating Microcephaly. **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, n. 9, p. 707–713, set. 2013.

XING, L.; WILSCH-BRÄUNINGER, M.; HUTTNER, W. B. How Neural Stem Cells Contribute to Neocortex Development. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 5, p. 1997–2006, 1 nov. 2021.

YANG, J.; HU, X.; MA, J.; SHI, S.-H. Centrosome Regulation and Function in Mammalian Cortical Neurogenesis. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 69, p. 256–266, ago. 2021.

YIGIT, G.; BROWN, K. E.; KAYSERILI, H.; POHL, E.; CALIEBE, A.; ZAHNLEITER, D.; ROSSER, E.; BÖGERSHAUSEN, N.; UYGUNER, Z. O.; ALTUNOGLU, U.; NÜRNBERG, G.; NÜRNBERG, P.; RAUCH, A.; LI, Y.; THIEL, C. T.; WOLLNIK, B. Mutations in CDK5RAP2 Cause Seckel Syndrome. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 3, n. 5, set. 2015.

ZAQOUT, S.; KAINDL, A. M. Autosomal Recessive Primary Microcephaly: Not Just a Small Brain. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 784700, 2021.

ZHAO, L.; LIU, H.; YUAN, X.; GAO, K.; DUAN, J. Comparative Study of Whole Exome Sequencing-Based Copy Number Variation Detection Tools. **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 97, 5 mar. 2020.