

# Diagnóstico Neuropediátrico em Tempos de Exoma

Neuropediatric Diagnosis in Times of Exome

Nicolle F. Menezes<sup>1</sup>; Andréia de S. S. Moreira<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina do Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO

<sup>2</sup> Professora do curso de Medicina do Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO

---

## RESUMO

**Introdução:** O sequenciamento completo do exoma é um exame que utiliza a tecnologia de sequenciamento de nova geração para leitura das regiões codificantes do DNA, os éxons, sendo empregado nos últimos anos para o diagnóstico de doenças heterogêneas com componente genético. **Objetivos:** Relatar uma série de cinco casos de pacientes com doenças neurológicas submetidos ao sequenciamento completo do exoma. **Métodos:** Relato de série de cinco casos de pacientes com doenças neurológicas submetidos ao sequenciamento completo do exoma, associado a uma revisão de literatura sobre o exame. **Discussão:** No caso dos cinco pacientes relatos nesse TCC, o rendimento diagnóstico foi de 40%, contrastando com a taxa de 25% normalmente encontrada na literatura. **Conclusão:** O sequenciamento completo do exoma é uma ferramenta diagnóstica importante na prática neuropediátrica, auxiliando a complexa investigação etiológica dos distúrbios do neurodesenvolvimento.

**Descritores:** exoma; neuropediatria; genética

## ABSTRACT

**Introduction:** Whole exome sequencing is an examination that uses new generation sequencing technology to read DNA coding regions, the exons, and has been used in recent years for the diagnosis of heterogeneous diseases with genetic component. **Objectives:** To report a series of five cases of patients with neurological diseases submitted to whole exome sequencing. **Methods:** Serial report of five cases of patients with neurological diseases submitted to complete exome sequencing, associated with a review of the literature on the examination. **Discussion:** In the case of the five patients reported in this CBT, the diagnostic yield was 40%, contrasting with the rate of 25% usually found in the literature. **Conclusion:** Complete exome sequencing is an important diagnostic tool in neuropediatric practice, aiding the complex etiological investigation of neurodevelopmental disorders.

**Keywords:** exome; neuropediatric; genetic

## 1. Introdução

A partir de largo investimento no Projeto Genoma, com início em 1990, o mapeamento genético tornou-se uma realidade. Devido ao elevado custo, durante muitos anos o seu uso foi restrito à pesquisa. Com a comercialização em 2005 do sequenciamento de nova geração, milhares de pares de bases de DNA podem ser lidas em apenas uma corrida, barateando as análises genéticas e possibilitando sua integração no arsenal diagnóstico da prática clínica<sup>1,2</sup>.

O sequenciamento de nova geração engloba grandes painéis gênicos, como o sequenciamento de todo o genoma e o sequenciamento completo do exoma (SCE)<sup>3</sup>. Este último analisa apenas os éxons, parte codificante do DNA que, embora represente menos de 2% em tamanho, contém várias mutações patogênicas que levam a alterações estruturais e funcionais em proteínas<sup>2,4</sup>. Por exemplo, dentro dos éxons encontram-se 85% das mutações causadoras de mais de seis mil doenças genéticas com padrão de herança mendeliano<sup>5</sup>. Seu uso é inovador, posto que além de ser a parte mais conhecida e estudada do DNA, possui o custo de 1/6 do valor em comparação com o sequenciamento de todo genoma, além de ocupar 1/15 do espaço necessário para armazenamento<sup>6,7</sup>. Somando-se rapidez com custo-benefício, o SCE está se consagrando como uma ferramenta poderosa para avaliação genética de doenças complexas e monogênicas. Segundo o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) a solicitação do exame é pertinente quando: 1) o paciente possui um defeito genético suspeito, mas com um fenótipo que não se enquadra em nenhuma síndrome que possa ser diagnosticada; 2) a apresentação clínica da doença pode ter como causa diversas alterações genéticas; ou 3) o paciente tem um diagnóstico suspeito que não pode ser confirmado por outros exames<sup>8</sup>.

Na prática neuropediátrica, muitos pacientes possuem fenótipos heterogêneos, impossibilitando o teste de todos os genes possivelmente envolvidos ou, possuem distúrbios mendelianos que não são diagnosticados através de técnicas de microarranjo de DNA<sup>9</sup>. O atraso no diagnóstico é maléfico pois retarda o início de um possível tratamento, aconselhamento familiar sobre recorrências e orientações acerca da doença, como complicações relacionadas e prognóstico<sup>10,11</sup>. Ainda há controvérsias sobre quando o exame deve ser solicitado, geralmente apenas no caso de insucesso na elucidação diagnóstica. A maioria dos pacientes é previamente submetido a exames como cariótipo, FISH, microarranjo de DNA, testagem de genes específicos e de erros inatos do metabolismo.

Todavia, alguns autores defendem o uso como primeira linha nos casos em que o palpite diagnóstico não é preciso, posto que o valor do exoma equivale ao de 2 a 4 sequenciamentos gênicos únicos<sup>2,4,6,12</sup>. O método apresenta como limitação a não detecção de grandes deleções e inserções, rearranjos cromossômicos estruturais, repetições de trinucleotídeos, variações intrônicas e modificações epigenéticas. Além disso, ao custo que já é alto, deve-se acrescentar o valor de um segundo método confirmatório, como método de Sanger, para validar os resultados positivos. Por fim, há questões éticas acerca de achados incidentais<sup>12,13,14</sup>.

Assim, o SCE representa uma quebra recente de paradigma da complexa investigação etiológica dos distúrbios do neurodesenvolvimento, apresentando uma acurácia diagnóstica em torno de 25%, acrescido da possibilidade de releitura do exame conforme novas descobertas e melhoria de análises são feitas<sup>15,16,17,18</sup>.

O presente trabalho tem por objetivo relatar uma série de cinco casos de pacientes com doenças neurológicas que foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma, mostrando como o resultado auxiliou o prognóstico, o aconselhamento genético e diminuiu a ansiedade familiar em relação ao diagnóstico até então desconhecido.

## **2. Métodos**

Trata-se de uma série de casos de pacientes neurológicos que foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma, associado a uma revisão de literatura sobre o exame. Os dados dos casos foram obtidos de prontuários de pacientes acompanhados a nível privado pela orientadora deste estudo. Para preservação dos pacientes envolvidos, estes não serão identificados e será usado o Termo de compromisso de dados (em anexo). O projeto foi aprovado em Comitê de Ética em Pesquisa e registrado na Plataforma Brasil (CAAE: 65125617.2.0000.5247).

Para a preparação da revisão da literatura, foram utilizadas diversas fontes de literatura nacional e internacional, abrangendo estudo de casos, artigos de revisão bibliográfica e metanálises publicados entre 2010 a 2016, escritos na língua inglesa e portuguesa, através de pesquisa realizada nos sites da BIREME, Pubmed, Scielo, Medline e Lilacs. Os termos utilizados para o levantamento bibliográfico foram: “sequenciamento completo do exoma”, “exoma”, “exoma + neuropediatria” e “diagnóstico genético” “sequenciamento de nova geração”. Foram utilizados os mesmos termos também em inglês.

## **4. Resultados**

Nesse capítulo, são apresentados cinco estudos de caso de pacientes com doenças neurológicas que foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma.

### **4.1 Relato de caso (1)**

Paciente do sexo masculino, 21 anos, natural e residente da Região Serrana do Rio de Janeiro. Paciente compareceu à consulta neuropediátrica em novembro de 2009, com 15 anos de idade. Mãe refere que era portador de imunodeficiência primária, síndrome de Hiper-IgM ligada ao cromossomo X e fazia reposição mensal de imunoglobulina G humana para melhor controle dos episódios infecciosos.

As manifestações infecciosas iniciaram na época em que era lactente e naquele momento apresentou quadro de encefalite que resultou em sequelas neurológicas, tais como: incoordenação motora e alterações cognitivas. Refere que entre dois e três anos de idade apresentou inúmeras crises tônico-clônicas generalizadas e foi iniciado o anticonvulsivante oxcarbazepina. Segundo a mãe, as crises foram controladas com essa medicação aos nove anos de idade. No início do ano de 2009, a incoordenação motora fina se intensificou e começou a apresentar incoordenação da marcha e piora da incoordenação motora grosseira. Em poucos meses evoluiu para síndrome cerebelar franca com marcha atáxica, dismetria, disdiadocinesia, disartria e apraxia do olhar.

Na primeira consulta neuropediátrica, além do quadro cerebelar descrito apresentava movimentos involuntários do tipo coreoatetose, disfagia e telangiectasias em conjuntivas. Trazia como exames complementares: exame de líquido cefalorraquidiano normal, dosagem de vitamina E normal e ressonância nuclear magnética (RNM) do encéfalo mostrando discreta atrofia cortical.

Aventada a possibilidade de Síndrome de Louis-Barr, apesar da análise de alfafetoproteína dentro dos parâmetros da normalidade. Foi encaminhado à Rede Sarah para continuidade da avaliação, visando análise molecular para aquela síndrome. Na Rede Sarah, foi submetido à ampla investigação diagnóstica, onde os exames realizados afastaram causas de ataxia de início agudo/subagudo, tais com deficiência de vitamina E, acantocitose abetalipoproteinemia e etiologias infecciosas. Repetida a RNM de encéfalo, na qual se observou atrofia cortical mais evidente que no exame anterior, além de discreta atrofia cerebelar. Observa-se, também, atrofia óptica bilateral ao exame de fundo de olho. Foi realizada análise molecular para Ataxia de Friedreich que se mostrou negativa.

Entre novembro de 2009 e junho de 2010, a deterioração neurológica foi rápida e o menor ficou totalmente dependente de seus familiares. Clinicamente apresentava uma síndrome neurológica mista com sinais piramidais, extra-piramidais e cerebelares. Em março de 2010, foi realizado o cariótipo com pesquisa de instabilidade cromossômica que evidenciou ausência de alterações cromossômicas características de ataxia-telangiectasia. No mesmo ano, foi submetido à gastrostomia, visto que apresentava incoordenação na sucção/mastigação e deglutição. No ano de 2011, as crises convulsivas retornaram, porém apresentavam um padrão de mioclonia e foi introduzido ácido valpróico. Diante do quadro de regressão neurológica associado à atrofia cerebelar e óptica e epilepsia mioclônica aventou-se a hipótese de lipofuscinose ceróide neuronal. Não foi possível a realização de biópsia de conjuntiva, dificultando o diagnóstico. O quadro neurológico evoluiu de forma progressiva durante o ano de 2011, com persistência das crises, havendo necessidade da associação de dois outros anticonvulsivantes: lamotrigina e clobazam. No início de 2012, o paciente se encontrava em estado vegetativo persistente, com traqueostomia e ventilação assistida, sem resposta à estímulos visuais e auditivos. Do ponto de vista clínico, apresentava quadriparesia espástica com sinais piramidais e movimentos involuntários de língua.

O quadro neurológico permaneceu estável e, no ano de 2014, foi realizado sequenciamento do exoma evidenciando mutação patogênica no gene da ATM, confirmando o diagnóstico de ataxia-teleangiectasia.

Em 2016, o paciente iniciou quadro de disautonomia com instabilidade hemodinâmica e da homeostase corporal, evoluindo para óbito.

#### **4.2 Relato de caso (2)**

Paciente do sexo feminino, 12 anos, natural e residente da Região Serrana do Rio de Janeiro. Paciente compareceu à consulta neuropediátrica em abril de 2009, acompanhada dos responsáveis legais, com quatro anos e nove meses, e com relato de marcha escarvante com surgimento aos três anos de idade. Já havia sido submetida a RNM do encéfalo que não revelou anormalidades, assim como a uma avaliação ortopédica que, através de radiografias e escanometria, descartou defeitos estruturais que justificassem o quadro.

Ao exame apresentava hemiplegia e hiperreflexia à esquerda, associadas a comportamento agitado. A família foi orientada a procurar a rede Sarah para investigação diagnóstica mais abrangente. Na unidade, foi realizada uma série de exames laboratoriais que descartaram erros inatos do metabolismo, imunodeficiências, doenças lisossômicas, ataxias espinocerebelares, defeitos congênitos da glicolização e instabilidade cromossômica através do cariótipo, dentre outras doenças. A eletroneuromiografia estava dentro dos limites da normalidade, assim como o potencial evocado auditivo e visual.

Em setembro de 2010, a paciente apresentou a primeira crise convulsiva, iniciando o uso de oxcarbazepina. Tal conduta a manteve sem crise durante um ano, quando teve seu primeiro estado de mal epilético (EME) que resultou em nove dias de internação, com indução de coma com propofol durante 24h para abortamento da crise. Quatro meses depois, em janeiro de 2012, segundo EME, com indução de coma durante 48h com propofol e 12 dias inconsciente. Nova RNM do encéfalo e da sela túrsica foram realizadas sem alterações. Foi adicionado o ácido valpróico e clobazam ao esquema terapêutico.

Em março e em julho de 2012, a paciente sofreu duas novas crises convulsivas sem evoluir para estado comatoso. Na consulta de outubro de 2012, apresentava, além das dificuldades motoras, atraso na linguagem, deficiência intelectual, dificuldades no aprendizado, hiperfagia, obesidade, hipotonia e tremores de cabeça e membros. Foi aventada a possibilidade de síndrome de Prader Will e solicitado pesquisa para a mesma, que foi negativa. Para complementação diagnóstica solicitou-se o teste de microarranjo de DNA que não demonstrou alterações.

Em 2014, já com 10 anos, a paciente continuava com o mesmo exame neurológico e sem elucidação diagnóstica quando foi solicitado o sequenciamento completo do exoma, que evidenciou retardo cognitivo e epilepsia associados ao gene MECP2 (síndrome de Rett). Atualmente, a paciente continua em acompanhamento clínico e reabilitação neuropsicomotora.

### **4.3 Relato de caso (3)**

Paciente do sexo feminino, 13 anos, natural e residente da Região da Baixada Fluminense do Rio de Janeiro. Paciente compareceu a consulta neuropediátrica em março de 2007, com três anos e sete meses e diagnóstico de síndrome de ADEM em uso de corticoterapia oral. Ao exame apresentava força e tônus muscular normal, leve incoordenação motora, reflexos preservados e discreta ptose à direita. Evoluiu com melhora clínica. \

Seis anos depois, em abril de 2013, apresentou novo quadro neurológico, com bradipsiquismo, hipotonia generalizada, hemiparesia à esquerda com clônus ipsilateral, movimentos involuntários do tipo distonia de mão, disartria, ataxia, postura viciosa da cabeça e incoordenação motora. Inicialmente suspeitou-se de ADEM recorrente e foi solicitado nova RNM do encéfalo, assim como prescrito pulsoterapia e imunoglobulina humana, fenitoína, topiramato e clonazepam, além de fisioterapia e fonoaudiologia.

Como a paciente não apresentou melhora clínica nem radiológica com o tratamento instituído, e a RNM do encéfalo relevou novas lesões com padrão cortical e predomínio de gânglios da base, foi aventada a hipótese de doença mitocondrial. Quatro meses depois a paciente apresentou melhora do quadro neurológico, mantendo discreta hemiparesia à direita. Foi realizada outra RNM do encéfalo que evidenciou importante melhora radiológica, com significativa redução das lesões que comprometiam de modo bilateral e simétrico o putamên, núcleo caudado e tálamo, associado a resolução quase completa das lesões corticais. O laudo radiológico sugeriu que tal evolução era compatível com desordem mitocondrial (doença de Leigh e Mellas).

Em agosto de 2014 a paciente foi submetida ao sequenciamento completo do exoma que não evidenciou nenhuma anormalidade genética, descartando doenças mitocondriais. Considerando a história clínica e a ausência de anormalidades genéticas, o diagnóstico definitivo da paciente foi de Síndrome de ADEM recorrente. A paciente atualmente está com o cognitivo preservado e desenvolvimento neuropsicomotor adequado, com bom rendimento escolar, mantendo como sequela uma leve hipotonia, incoordenação motora fina e discreta hemiparesia à esquerda.

#### **4.4 Relato de caso (4)**

Paciente do sexo masculino, 10 anos, natural e residente da Região Serrana do Rio de Janeiro.

Paciente compareceu a consulta neuropediátrica em fevereiro de 2011, com quatro anos e três meses, acompanhado dos familiares, com relato sugestivo de crise convulsiva única parcial complexa de curta duração. Trazia consigo um eletroencefalograma (EEG) sem alterações e não possuía anormalidades no exame neurológico. Entre o mês de abril e junho o paciente apresentou novas crises motoras parciais de curta duração e, optou-se por iniciar terapia anticonvulsivante com oxcarbazepina. No mês de julho, o paciente tinha crises diárias de mioclonia com perda do tônus e queda e um vídeo EEG de quatro horas foi solicitado, assim como uma RNM. Não houve manifestação clínica durante o vídeo-EEG nem alteração na RNM do encéfalo e o ácido valpróico foi iniciado na tentativa de controle das crises. Em setembro, o paciente começou a apresentar alterações no exame físico como incoordenação motora fina e alteração na marcha, piorando acentuadamente no mês de outubro. A RNM do encéfalo manteve-se inalterada, e novo EEG relevou caráter irritativo focal frontocentroparietal esquerdo, intensificado pelo sono e pela luz. Foi aventada a possibilidade diagnóstica de Síndrome de Doose (epilepsia mioclônico-astática) e instituída dieta cetogênica.

Diante de deterioração motora importante, com ataxia, tremor de ação e marcha anseriana optou-se pela adição de clobazam ao esquema de ácido valpróico e Lamotrigina. Posteriormente também se fez necessário o acréscimo de Levetiracetam, resultando em adequado controle das crises. Nova RNM do encéfalo em setembro de 2012 relevou atrofia cortical, e o exame do líquido cefalorraquidiano realizado não revelou anormalidades.

Aos exames laboratoriais, além de plaquetopenia, evidenciou-se hipotireoidismo, com respectiva suplementação hormonal. Em março de 2014 o paciente foi submetido ao sequenciamento completo do exoma que não indicou alterações genéticas. No momento o paciente não apresenta mais crises mioclônico-astática e mantém o comprometimento cognitivo e os déficits motores. EEG realizado em 2016 com atividade teta difusa e bilateral, predomínio posterior, acentuada pela hiperpneia. Impressão diagnóstica final: Síndrome de Doose.

#### **4.5 Relato de caso (5)**

Paciente do sexo feminino, 7 anos, natural e residente da Região Serrana do Rio de Janeiro. Paciente compareceu a consulta neuropediátrica em agosto de 2013, com dois anos e nove meses e história de crises convulsivas heterogêneas desde o segundo ano de vida, associado a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Fazia uso de oxcarbazepina acima da dose máxima recomendada.

Na história patológica pregressa, cardiomiopatia não especificada. Pais não consanguíneos. Ao exame a paciente só falava monossílabas, engatinhava, apresentava hipotonia generalizada com reflexos preservados e dimorfismos faciais. Foi realizado ajuste terapêutico da dose de oxcarbazepina e associado ácido valpróico, além de indicado o uso supositório de diazepam, se necessário. Na investigação de doenças genéticas foi solicitado focalização isoeétrica da transferrina que não apresentou alterações, descartando a suspeita de defeitos congênitos da glicosilação.

Apesar do uso de anticonvulsivantes a paciente manteve média de uma crise a cada dois meses. Posteriormente foi possível a retirada da oxcarbazepina. Em setembro de 2014 foi realizado o sequenciamento completo do exoma que evidenciou doença mitocondrial com mutação em homoplasmia patogênica, no gene MT-RNR1, predispondo a surdez neurosensorial em exposição a aminoglicosídeos. Frente ao resultado do exame foi solicitado o potencial evocado auditivo do tronco encefálico (BERA) que não evidenciou perdas auditivas.

Em março de 2016, com seis anos, a paciente continuava o uso do anticonvulsivante ácido valpróico, começou a andar com apoio, apresentava personalidade agressiva e saúde geral em bom estado. A investigação genética foi continuada com a solicitação de microarranjo de DNA, que evidenciou Síndrome de deleção do 1p36, com comprometimento dos genes GABRD (relacionado a epilepsia) e PRDM16 (relacionado a cardiomiopatias). O diagnóstico foi concluído e atualmente a paciente prossegue em acompanhamento clínico e na reabilitação neuropsicomotora.

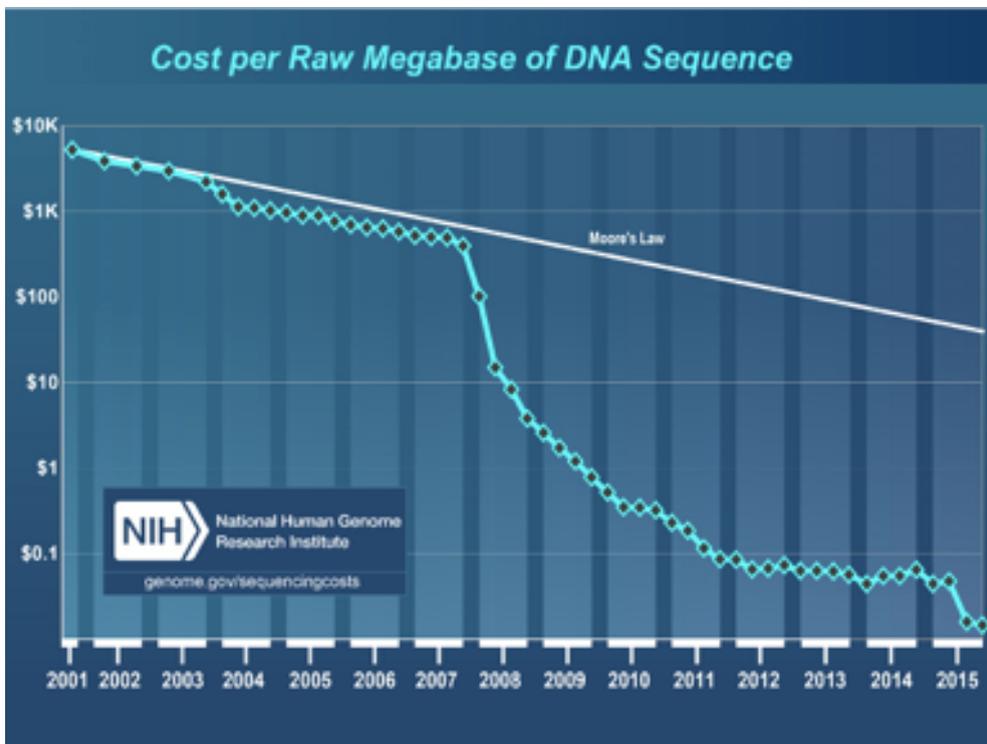
## 5. Revisão da Literatura

Diversas doenças neurológicas possuem em sua gênese anormalidades genéticas. A alteração pode repercutir de duas formas: (1) de forma direta, como ocorre em cromossomopatias e em distúrbios monogênicos (Mendelianos) envolvendo o funcionamento normal do cérebro, dos nervos periféricos, dos nervos cranianos e de músculos; ou (2) de forma indireta, como nas doenças complexas, que resultam da combinação entre genética, susceptibilidade e fatores estocásticos<sup>9</sup>.

O diagnóstico neurológico baseia-se inicialmente em história clínica, história familiar e exame físico, complementado, conforme necessidade, com exames de imagem, análises histopatológicas, análises laboratoriais, investigação genética, dentre outros<sup>8,9</sup>. Considerando a heterogeneidade das doenças neuropediátricas (principalmente em se tratando de perda auditiva, espectro autista, miopatias/distrofias musculares e ataxias hereditárias), muitos pacientes continuam sem elucidação diagnóstica mesmo após uma exaustiva e onerosa investigação<sup>19, 20, 21</sup>. Isto ocorre porque: (1) o paciente é portador de uma doença complexa; (2) pela ocorrência do “locus heterogêneo”, quando mutações em vários genes diferentes podem se relacionar com a mesma expressão clínica da doença; e (3) pela presença de modificadores que interagem com mutações pontuais, uma causa comum de heterogeneidade<sup>9,22,23</sup>.

Em se tratamento do diagnóstico através de análises genéticas, o sequenciamento de nova geração se impôs como grande inovação tecnológica ao permitir a leitura de alto empenho da informação de aproximadamente 20.000 genes em uma única corrida. A alternativa anterior a esta leitura de bilhões de fragmentos simultâneos era o sequenciador de eletroforese, que só é capaz de processar até 96 fragmentos por vez<sup>9,22,24</sup>. Em face dessa tecnologia, o custo por megabase de DNA sequenciado diminuiu drasticamente, permitindo o seu uso além do âmbito das pesquisas (ver Figura 1)<sup>2</sup>.

**Figura 1 – Custo por megabase bruto de DNA sequenciado<sup>26</sup>**



O número de bases contempladas varia dentre as plataformas comerciais utilizadas. A da SureSelect V4 dispõe da análise de 20 965 genes e 334 378 éxons, enquanto a do laboratório Illumina TruSeq compreende 20 794 genes e 201 121 éxons<sup>23,25</sup>.

No mês de fevereiro de 2017, uma consulta orçamentária realizada a um laboratório brasileiro, via endereço eletrônico, apresentou custo para uma análise de SCE de 35 a 50 mil variantes de DNA, com interpretação diagnóstica, de aproximadamente 10 mil reais. O valor contemplava a confirmação de mutações relevantes por outros métodos diagnósticos, possibilidade de teste adicional nos pais e releitura do exame, conforme necessidade. Embora o preço do exame represente uma restrição ao uso corriqueiro na prática clínica, o valor apresentou queda exponencial de preço com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração. Em 2001, através do Projeto Genoma, a primeira compilação do genoma humano custou 2.7 bilhões de dólares. Em 2008, 1.5 milhão de dólar e, em 2011, com o advento da tecnologia, 10 mil dólares (0.66% do valor em 2008)<sup>1</sup>.

Para solicitação do exame é necessário colher informações acerca da história clínica do doente e da sua família, consultar a literatura médica disponível e banco de dados atualizado, além de obter consentimento do paciente<sup>12</sup>. Para sua realização, inicialmente o DNA é extraído, comumente de sangue periférico, purificado e fragmentado em pequenos fragmentos (1 kb). Depois, os éxons são separados do restante do material genético e enriquecidos. Em seguida são processados através dos sequenciadores de nova geração. Uma média de 30 leituras costuma ser suficiente para uma boa cobertura, embora 100 vezes seja o ideal.

A qualidade dos dados obtidos é verificada através de software de bioinformática, e, as leituras inferiores ao padrão estipulado são excluídas. Então, o material genético do paciente é pareado com um genoma-padrão (elaborado pelo Projeto Genoma e atualizado constantemente). A próxima etapa é a filtragem, quando as variantes encontradas no pareamento são comparadas com o DNA de mais de 10.000 genomas para minimizar o risco de falso positivo, separando os polimorfismos comuns. As alterações, então, são classificadas como deletérias (variantes potencialmente patogênicas), variantes de significado indeterminado e variantes benignas. Para um resultado final é preciso parear a possível anormalidade genética com as hipóteses diagnósticas e o quadro clínico do doente, afim de validação clínica<sup>1,2,10,11,20</sup>.

A identificação de variantes deletérias ainda representa um desafio na interpretação do SCE posto que cada exoma possui individualmente uma média de 13.500 polimorfismos de base única (SNP, em inglês, indicando quando só uma base do DNA é alterada) não sinônimos<sup>27</sup>. Isso quer dizer que existem mais de 10.000 alterações genéticas em cada indivíduo que são capazes de alterar sequências proteicas, produzindo proteínas com diferentes atividades biológicas. Como essas alterações possuem uma frequência maior que 1% em determinada população, não podem ser denominadas de mutação<sup>28</sup>. Cada pessoa normalmente tem 50-100 mutações heterozigóticas capazes de gerar doença Mendeliana recessiva quando no estado homozigótico<sup>21</sup>.

Geralmente os resultados encontrados são validados através de exames diagnósticos tradicionais, como pelo método de Sanger e pela amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR). Esse procedimento aumenta a sensibilidade do método ao permitir uma melhor avaliação de regiões com baixa cobertura (como regiões ricas em bases A-T, C-G e com pseudogenes). Um estudo realizado com 20.000 pacientes portadores de câncer hereditário que foram submetidos ao SCE/SCG por NGS com confirmação posterior pelo método de Sanger, obteve acurácia de 98.7%, evidenciando adequada validação analítica do método<sup>29</sup>. Embora tal prática promova um acréscimo ao custo já elevado e aumente tempo de entrega do resultado em 2 dias, a AMCG recomenda a validação das informações encontradas afim de evitar falsos positivos, principalmente quando relevantes intervenções médicas serão realizadas a partir dos resultados fornecidos<sup>22,29,30</sup>. Em se tratando de falsos negativos, esses geralmente resultam de baixa cobertura (5% dos éxons geralmente não são lidos), captura irregular, leitura de baixa qualidade (por exemplo, certas combinações de nucleotídeos que não são lidas repetitivamente), ou quando a alteração genética que deu origem a doença está localizada profundamente nos íntrons ou em regiões intergênicas e regulatórias. Outras limitações incluem a não detecção de deleções e duplicações acima de 8 a 10 nucleotídeos e de alterações epigenéticas (como acetilação, metilação, alterações na cromatina)<sup>1,8,12,31</sup>.

Com a incorporação do exame na prática clínica e maior abrangência populacional, um número crescente de mutações genéticas vem sendo identificadas. Isso faz com que o SCE tenha um papel duplo, não só como ferramenta diagnóstica, mas também como instrumento de descoberta de novos genes e alelos, contribuindo para o conhecimento principalmente de doenças mendelianas, mas também de doenças complexas e mutações somáticas nos cânceres<sup>22,32</sup>.

Como consequência, mais de 150 artigos já foram publicados sobre genes descobertos a partir do SCE<sup>21</sup>. Quando um variante novo é encontrado, os pais biológicos da criança devem ser testados (em trio) afim de averiguar se a variante é de fato nova (*de novo*). Paralelamente, o achado de uma mutação *de novo* no mesmo gene em um grupo pequeno de indivíduos afetados constitui evidência convincente de causalidade<sup>3,22,32</sup>. Há uma mobilização internacional para que o conhecimento adquirido seja divulgado. Por exemplo, a Universidade John Hopkins (EUA) disponibiliza um banco de dados, o *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), que na presente data possui mais de 15 mil genes causadores de distúrbios mendelianos catalogados, assim como os respectivos fenótipos associados<sup>34,35</sup>. Isso faz com que o SCE seja um exame dinâmico: conforme novo conhecimento é adquirido, pode haver a reinterpretação de uma variante descrita inicialmente como negativa. Por conta disso, geralmente os laboratórios colocam os pacientes com mutações raras em uma lista de observação<sup>12,17</sup>. Além da reanálise após descoberta de novos genes, a mesma pode ser indicada quando o fenótipo do paciente muda, com o surgimento de novas manifestações clínicas. Um estudo com reanálise de 346 SCE (média de 14 meses depois) obteve novos achados em 50% dos casos. Destes, em 11.2% (n=39) o resultado foi definitivo, em 16.3% (n=56) foi possível/provável e em 23.1% (n=80) um novo gene candidato a causador da doença foi encontrado<sup>14</sup>.

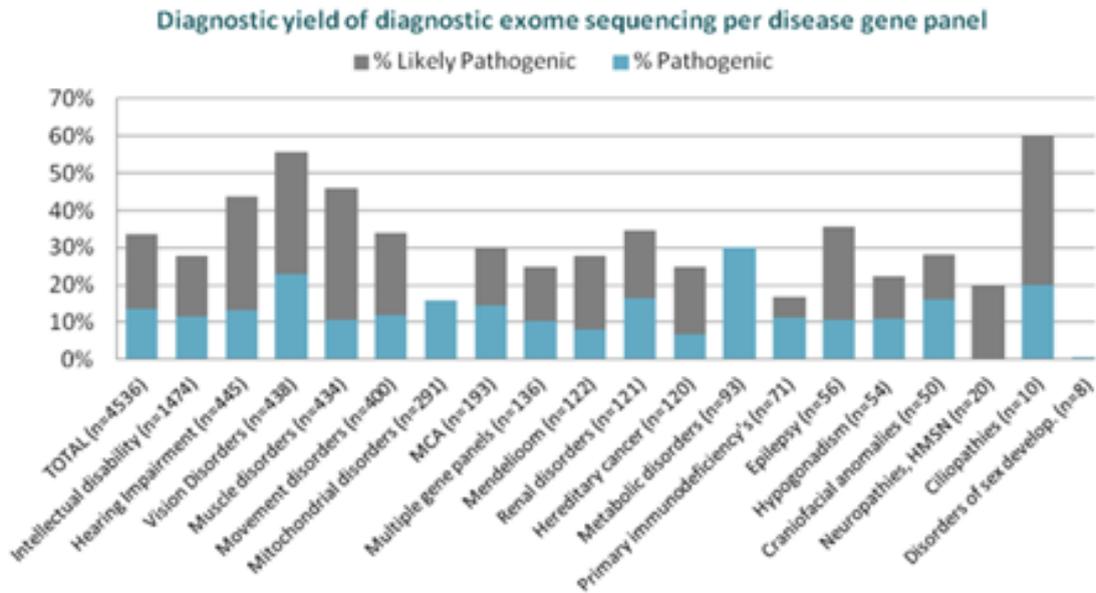
Questões éticas importantes permeiam a realização do exame já que o mesmo pode revelar informações importantes, como susceptibilidade a câncer, predisposição a doenças, descoberta de uma doença clinicamente ainda não manifestada em paciente assintomático, informações acerca da ancestralidade, além de influenciar decisões reprodutivas. Dito isso, é necessário aconselhamento genético prévio para que o paciente esteja ciente dos benefícios da realização do exame, como a descoberta de achados incidentais (achados positivos não esperados). A ACMG recomenda que os laboratórios relatem mutações encontradas dentre uma lista de no mínimo 56 genes responsáveis por 24 doenças monogênicas relevantes, independente da indicação clínica do doente. É esperado que 1-3% dos pacientes apresentem tais achados<sup>12,36</sup>. Ademais, também é prudente informar alterações genéticas que não constem na lista, mas que tenham alta relevância clínica, ou que possuam um tratamento padrão a ser instituído. Por fim, outros questionamentos éticos surgem, como: A família do paciente tem direito de ser informada? O paciente tem que autorizar a catalogação anônima em banco de dados? E o seu direito e autonomia em não saber dos achados incidentais? Até onde cabe aos laboratórios informar?<sup>21,37</sup>. Tais preocupações éticas são ainda mais relevantes considerando o uso do SCE não só como método diagnóstico; com o surgimento da medicina personalizada e terapia gênica, há imensa possibilidade de aplicações clínicas. Por exemplo, através do exame médicos podem identificar mutações adquiridas por um tumor de um paciente e ajustar o tratamento antitumoral conforme os achados<sup>16,34</sup>.

Por fim, outra modalidade do sequenciamento de nova geração é o sequenciamento completo do genoma (SCG), que compreende a leitura da maior parte do conteúdo de DNA contido em todo genoma indivíduo<sup>15</sup>. Em se tratando de exame diagnóstico para doenças neuropediátricas, o SCE tem as mesmas vantagens do SCG, com menor custo de leitura, de análise e de armazenamento. Por exemplo, a quantidade de dados gerada através do SCG é 100 vezes superior que a do SCE, e, embora um SCG possa ser realizado em um período de uma semana em uma única máquina, é possível realizar a leitura simultânea de 20 SCE. Dessa forma, a não ser que o foco seja regiões não codificantes ou alterações genéticas estruturais, a solicitação do SCG ainda não apresenta custo-benefício efetivo, considerando os empecilhos tecnológicos, analíticos e ético envolvendo a imensa quantidade de informação genética gerada. O seu potencial será plenamente alcançado quando possuímos mais conhecimentos acerca dos 98-99% do DNA que representa as regiões não codificantes. Até lá, o SCE vai continuar como escolha inicial dentre as modalidades de sequenciamento de nova geração<sup>1,22,25,33</sup>.

## **6. Discussão**

As doenças neuropediátricas configuram uma indicação comum para realização do SCE, conforme evidenciando por Brunner em uma análise de 4536 exames. Dentre eles, a principal indicação foi a deficiência intelectual, em 32.5% dos pacientes (ver Figura 2)<sup>38</sup>. Na literatura, a média de rendimento diagnóstico com o exame gira em torno de 25%. Embora esse valor pareça pequeno, é superior a positividade de outros testes genéticos, como o cariótipo e o microarranjo de DNA, que são resolutivos em 15 a 20% dos casos<sup>17</sup>.

### **Figura 2 – Rendimento diagnóstico do SCE por painel de doença<sup>38</sup>**



Dentre os cinco relatos de casos apresentados neste trabalho de conclusão de curso, o SCE elucidou o diagnóstico de dois pacientes, alcançando uma taxa de positividade de 40%. No caso do paciente (1) a hipótese diagnóstica inicial foi de Ataxia–Telangiectasia devido ao início do quadro neurológico insidioso e a associação com imunodeficiência. Entretanto, a evolução rapidamente progressiva para estado vegetativo persistente é atípica para tal enfermidade. A investigação diagnóstica foi ampla para ataxias progressivas e não evidenciou alterações. Na interpretação do cariótipo com pesquisa de instabilidade cromossômica foi relatado ausência de alterações cromossômicas características de Ataxia-Telangiectasia.

Os valores de alfafetoproteína sérica estavam dentro da normalidade. Optou-se pelo sequenciamento de exoma que evidenciou mutação patogênica no gene da ATM, confirmando o diagnóstico de Ataxia-Telangiectasia. No caso da paciente (2), o diagnóstico da síndrome de Rett foi descartado inicialmente já que a paciente não contemplava os critérios clínicos necessários e o microarranjo de DNA realizado não apresentou alterações. Entretanto, ao realizar o SCE, verificou-se uma mutação no gene MEPC2, associada a formas atípicas da síndrome, com graus diversos de epilepsia e deficiência cognitiva, sem as manifestações motoras e comportamentais típicas. Uma vez que a variante encontrada c.520A>G (p.Arg174Gly) não havia sido previamente relatada na literatura, foi realizada a investigação nos pais da paciente. Nenhum dos genitores apresentou a variante supracitada, estabelecendo a origem desta alteração como *de novo*.

A paciente do relato de caso (3), embora sem SCE alterado, teve seu diagnóstico clínico de exclusão facilitado pela ausência de alterações no exame. O diagnóstico da paciente inicial foi de ADEM recorrente, mas, como a mesma não apresentou melhora clínica nem radiológica com o uso de imunoglobulinas e pulsoterapia, apresentando surgimento de novas lesão cerebrais apesar do tratamento instituído, foi aventada a possibilidade de doença mitocondrial. A ausência de base genética para os episódios recorrentes de encefalomielite aguda disseminada (o SCE incluiu a análise do DNA mitocondrial) permitiu o diagnóstico presumível de ADEM recorrente com apresentação/evolução atípica.

O paciente (4), por sua vez, apresentou crises convulsivas com predomínio mioclônico, de difícil controle medicamentoso e importante deterioração neurológica. Foi beneficiado com o resultado do SCE, já que a exclusão de base genética para epilepsia permitiu o diagnóstico presuntivo de Síndrome de Doose (epilepsia mioclônico-astática), considerando as manifestações e a evolução clínica do doente. Algumas mutações gênicas já foram relatadas em pacientes portadores da síndrome (como o SCN1A e o SLC6A1 relacionadas ao receptor GLUT-1), mas sua causalidade e relevância ainda não estão bem estabelecidas na literatura. Por fim, a paciente (5), que possuía história de crises convulsivas heterogêneas, dismorfismos faciais e cardiomiopatia, foi submetida ao SCE que não relatou alterações que justificassem o quadro clínico, só uma predisposição a surdez neurosensorial mediante a exposição aos aminoglicosídeos. Entretanto, exame de microarranjo de DNA realizado posteriormente, evidenciou Síndrome de deleção do 1p36, com comprometimento dos genes GABRD (associado a epilepsia) e PRDM16 (relacionado a cardiopatia). Tal circunstância ilustra falha do método, como melhor descrito anteriormente, seja por tamanho da deleção, por cobertura insatisfatória, baixa qualidade da captura, etc. Assim, é de extrema importância que os laboratórios forneçam relatório detalhando a qualidade de corrida, como: porcentagem de bases-alvo com pelo menos 10 leituras; número médio que cada base foi lida e número de sequências geradas<sup>23</sup>.

Para efeitos de comparação, são elencados a seguir uma gama de estudos elaborados a partir da realização do SCE em pacientes predominantemente com doenças neuropediátricas. Um estudo realizado na Universidade de Columbia, EUA analisou 115 prontuários de pacientes submetidos ao exame. As principais indicações foram: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (25.2% dos pacientes); malformações congênitas (24.3%) e convulsões (14%). Um diagnóstico definitivo foi obtido em 37 pacientes (32.2% dos casos)<sup>10</sup>. Outro estudo, realizado pelos pesquisadores da *Baylor College of Medicine* no Texas (EUA) submeteu 250 pacientes, 80% deles crianças com doenças neurológicas, com fenótipos sugestivos de causas genéticas, ao SCE. Foram identificadas 86 mutações em alelos altamente sugestivos de patogenicidade em 62 dos 250 pacientes, com uma taxa de elucidação diagnóstica em 25%<sup>11</sup>. Já um estudo realizado em Baltimore (EUA) no *Kennedy Krieger Institute* com 78 pacientes que se apresentaram na clínica neuropediátrica deste estabelecimento com distúrbios neurológicos, revelou uma taxa de diagnóstico positivos presumido de 41%, considerando mutações altamente sugestivas e sugestivas de patogenicidade<sup>8</sup>.

Outro exemplo de estudo foi o realizado por Dixon-Salazar, que submeteu 118 pacientes com distúrbio do neurodesenvolvimento identificados na infância, de diversas regiões do mundo com alta prevalência de consanguinidade, ao SCE, afim de avaliar doenças monogênicas recessivas. Mutações causadoras de doença foram identificadas em 40 pacientes (19%), sendo que em 10 pacientes (8%) o diagnóstico inicial presumido foi alterado<sup>39</sup>. Uma pesquisa realizada na América do Norte, através de questionários eletrônicos enviados para médicos de 47 centros de genética clínica revelou uma taxa de positividade para SCE de aproximadamente 23%. Vale ressaltar que esta pesquisa não utilizou grupo controle específico de pacientes<sup>40</sup>. Por fim, um estudo conduzido com 51 crianças provenientes da Alemanha e da Suíça, com deficiência intelectual grave não sindrômica, encontrou mutação causal provavelmente relacionada ao quadro de retardo mental em 12 pacientes (23,5%)<sup>41</sup>.

Analisando os estudos supracitados, tem-se uma média de 24.25% de positividade, com uma mediana de 27.3%. O percentual de rendimento dos casos clínicos apresentados (40%) é superior ao comumente encontrado na literatura. Entretanto, a amostra relatada (n=5) é bem menor que a dos estudos citados, de forma que um paralelo preciso não pode ser estabelecido. Outra dificuldade metodológica apresentada é que diferentes sequenciadores e plataformas foram utilizados, tanto nos estudos apresentados quanto nos SCE realizados pelos pacientes relatados. Além disso, variação na resolução e cobertura do exame é esperado e inerente a execução do método<sup>2</sup>.

## **7. Conclusão**

É indubitável que o sequenciamento completo do exoma está se consagrando como ferramenta diagnóstica, conquistando rapidamente espaço entre geneticistas, neurologistas, pediatras e oncologistas. Entretanto, o exame provavelmente não irá substituir métodos tradicionais quando a doença tem correlação genótipo-fenótipo bem estabelecida, ou quando o médico sabe especificamente qual painel gênico solicitar. Isso porque as plataformas de sequenciamento de nova geração apresentam maior chance de erro comparado com o método de Sanger e o microarranjo de DNA. Entretanto, é esperado que o rendimento do SCE aumente com as melhorias tecnológicas, como maior cobertura de éxons, detecção de CNVs (do inglês copy-number detection) e melhora na leitura irregular. Outra desvantagem é que o custo ainda representa um fator limitante posto que engloba o valor da leitura do exoma, do seu armazenamento e da sua análise por profissional qualificado<sup>1,2</sup>

<sup>11,10,22,23</sup>

Na presente data o exame não consta no Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde da Agência Nacional de Saúde Suplementar, uma lista com a cobertura mínima obrigatória que deve ser ofertada pelos planos privados de saúde. Também não está incluso na Política Nacional de Atenção integral às Pessoas com Doenças Raras do Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, seu custeio costuma ser através de planos de saúde (por judicialização), por meios financeiros do próprio do paciente e de sua família, e, através de verba do SUS para projetos de pesquisa<sup>2,42,43,44</sup>. Por conta desses fatores limitantes, a maioria dos pacientes é submetida ao SCE após longa investigação diagnóstica através de outros testes genéticos, como cariótipo, FISH, microarranjo de DNA e testes para genes específicos.

Em se tratando da prática neuropediátrica, o SCE é um grande aliado na complexa investigação etiológica dos distúrbios do neurodesenvolvimento, com um rendimento diagnóstico em torno de 25%<sup>15-18</sup>. No caso dos cinco pacientes relatados nesse TCC, a acurácia do exame foi de 40%, maior do que a normalmente encontrada na literatura. É importante ressaltar que quando, após o SCE, um diagnóstico é estabelecido, há uma quebra do efeito deletério da ausência de diagnóstico, diminuindo a ansiedade do paciente, dos seus familiares e cuidadores. Isto permite a devida condução da doença e aconselhamento genético.

## 8. Referências

1. Majewski J, Schwartzenuber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? [J Med Genet](#). 2011 Sep;48(9):580-9.
2. Prota J. Sequenciamento completo do exoma para investigação etiológica de deficiência intelectual inespecífica. 2015. 32 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Avaliação de Tecnologias em Saúde, Instituto de Avaliação de Tecnologias em Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
3. Johnson N. E. Whole-exome sequencing in neurologic practice: reducing the diagnostic odyssey. [Neurol Genet](#). 2015 Dec 24;1(4):e37.

4. Pereira P. C. B, Melo FM, Marco LAC, Oliveira EA, Miranda DM, Silva ACS. Sequenciamento total do exoma como ferramenta de diagnóstico de acidose tubular renal distal. *J Pediatr*. 2015, 91(6): 583-9.
5. DLE Medicina Laboratorial. Sequenciamento completo do Exoma [acesso em 12 jan 2017]. Disponível em:  
<http://dle.com.br/biologia-molecular-genetica-humana/sequenciamento-completo-do-exoma>.
6. Teer JK, Mullikin JC. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 15; 19(R2): R145–51.
7. Mullikin J. Whole-exome Sequencing: Technical Details. National Human Genome Research Institute [cited 2017 Jan 12]. Available from:  
<https://www.youtube.com/watch?v=nh8Mkz9IzKM>.
8. Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, Barañño K, McClellan R, Jamal L et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol*. 2014; 76(4): 473–83.
9. Toft M. Advances in genetic diagnosis of neurological disorders. *Acta Neurol Scand*: 2014: 129 (Suppl. 198): 20–25.
10. Iglesias A, Anyane-Yeboah K, Wynn J, Wilson A, Truitt Cho M, Guzman E et al. The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. *Genet Med*. 2014 Dec;16(12):922-31.
11. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013 Oct 17; 369:1502-11.
12. Biersecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med*. 2014; 370(25): 2418-25.
13. Burke L. Overview of genetic testing and screening [cited 2017 Jan 12]. Available from:  
[https://geneticsinprimarycare.aap.org/Provider%20Education/Documents/IGYP\\_Webinar2\\_GeneticTestingScreening.pdf](https://geneticsinprimarycare.aap.org/Provider%20Education/Documents/IGYP_Webinar2_GeneticTestingScreening.pdf).

14. Williams E, Retterer K, Cho M, Richard G, Juusola J. Diagnostic yield from reanalysis of whole exome sequencing data. Poster session presented at: American College of Medical Genetics and Genomics; 2016 Apr 13; Tampa, FL.
15. ACMG Board of Directors, et al. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genetics in Medicine*. 2012, 14(8): 759-61.
16. Ku C, Cooper DN. Exome sequencing: a transient technology for molecular diagnostics? *Expert Rev Mol Diagn*. 2012, 12(3): 211-4.
17. Levenson, D. Whole-exome sequencing emerges as clinical diagnostic tool. *Am. J. Med. Genet*. 2014: 164: ix-x.
18. Lopes-Cendes I, Ribeiro PAO. Aspectos genéticos das epilepsias: uma visão atual. *Rev Med Clin Condes*. 2013; 24(6): 903-8.
19. Reed, U. C. Doenças neuromusculares. *J Pediatr*. Jul-Ago 2002; 1 suppl: 89-103.
20. Fleury Medicina e Saúde. Sequenciamento do exoma: Muito além do genoma. *Revista Médica*. 2015 (2), 20-23.
21. Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. [J Hum Genet](#). 2014 Jan;59(1):5-15
22. Ku C, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol*. 2012, 71(1): 5-14.
23. Ku C, Wu M, Cooper DN, Naidoo N, Pawitan Y, Pang B et al. Technological advances in DNA sequence enrichment and sequencing for germline genetic diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 2012;12(2):159-73.
24. Mardis, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. [Trends Genet](#). 2008 Mar;24(3):133-41.
25. Yongguo Y, Wu B, Wu J, Shen Y. Exome and whole-genome sequencing as clinical tests: a transformative practice in molecular diagnostics. *Clinical chemistry*. 2012, 58(11): 1507-9.
26. NIH – National Human Genome Research Institute. DNA Sequences cost [cited 2017 Mar 1]. Available from: <https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>.

27. Marian, A. J. Sequencing your genome: what does it mean? *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2014 Jan-Mar;10(1): 3-6.
28. Asan, Xu Y, Jiang H, Tyler-Smith C, Xue Y, Jiang T et al. Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms. *Genome Biology.* 2011;12(9):R95.
29. Mu W, Lu HM, Chen J, Li S, Elliott AM: Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and in next-generation sequencing panel testing. [J Mol Diagn.](#) 2016 Nov;18(6):923-32.
30. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine.* 2013 Sep;15(9):733-47.
31. Guo Y, Long J, He J, Li C, Cai Q, Shu X et al. Exome sequencing generates high quality data in non-target regions. *BMC Genomics.* 2012;13(1):194-103.
32. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. [Proc Natl Acad Sci U S A.](#) 2009 Nov 10;106(45): 19096–101.
33. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol.* 2011 Sep;12(9): 228.
34. Maher B. Genomes on prescription. *Nature.* 2011;478(737):22-4.
35. OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man [cited 2017 Feb 28]. Available from: <https://www.omim.org/>.
36. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine,* 2013, 15(7), 565-74.
37. ACMG Board of Directors. Points to consider for informed consent for genome/exome sequencing. *Genetics in Medicine,* 2013, 15(9): 748-9.
38. Brunner H. Lessons from 6000 exomes. Maastricht: Maastricht University, 2016.
39. Silva ABD, Moraes AAD, Medeiros JE, Pires FA, Zerlotti Filho E. Síndrome de Ataxia-Telangiectasia: a case report. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 1971;29(2): 219-26.

40. Helbig I. Epilepsy Genetics. MECP2 – Rett Syndrome in the era of exome-first studies [cited at 2017 Mar 1]. Available from: <http://epilepsygenetics.net/2016/11/21/mecp2-rett-syndrome-in-the-era-of-exome-first-studies/>.
41. Maranhão-Filho P. Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM). Revista Brasileira de Neurologia. 2007;43(4):21-6.
42. Carvill GL, McMahon JM, Schneider A, Zemel M, Myers CT, Saykally J et al. Mutations in the GABA transporter SLC6A1 cause epilepsy with myoclonic-atonic seizures. Am J Hum Genet. 2015;96(5): 808-15.
43. Jordan VK, Zaveri HP, Scott DA. 1p36 deletion syndrome: an update. [Appl Clin Genet](#). 2015;8:189–200.
44. Preto, P. M. Aspectos clínicos e eletrencefalográficos da Síndrome de Dravet e da Síndrome de Doose. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
45. Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpa N, Schroth J, Bielas S, Schaffer AE et al. Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. Sci Transl Med. 2012 Jun;4(138):7-9.
46. [Atwal PS](#), Brennan M, Cox R, Niaki M, Platt J, Homeyer M et al. Clinical whole-exome sequencing: are we there yet? Genetics in Medicine. 2014;16(9):717-9.
47. Rauch A, Wiczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. The Lancet. 2012;380(9854):1674-82.
48. Brasil. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde. Brasília: ANS; 2016. Disponível em: [http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais\\_para\\_pesquisa/Materiais\\_por\\_assunto/Rol\\_de\\_Procedimentos\\_2016\\_total.pdf](http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/Rol_de_Procedimentos_2016_total.pdf)

49. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de apoio aos gestores do SUS: organização da rede de laboratórios clínicos, 1. ed., 2.<sup>a</sup> reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003. Disponível em:

<https://pt.scribd.com/document/57885667/Manual-Apoio-Gestores>

50. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no Sistema Único de Saúde – SUS / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em:

[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_atencao\\_integral\\_pessoa\\_doencas\\_raras\\_SUS.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_atencao_integral_pessoa_doencas_raras_SUS.pdf)