

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA PARA
INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA DE
DEFICIÊNCIA INTELECTUAL INESPECÍFICA**

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA PARA
INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA DE
DEFICIÊNCIA INTELECTUAL INESPECÍFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso do Programa de Especialização em Avaliação de Tecnologias em Saúde do Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde.

Modalidade: Especialização

Aluna: Joana Rosa Marques Prota

Orientadora: Fernanda D'Athayde Rodrigues

2015

Eu, Joana Rosa Marques Prota, declaro não haver conflito de interesse com o tema deste parecer técnico-científico.

Intensidade da recomendação: Fraca

Indicação: Teste diagnóstico para investigação etiológica de pacientes com deficiência intelectual inespecífica, sem restrições quanto à faixa etária ou grau de acometimento do déficit intelectual.

Caracterização da tecnologia: Sequenciamento completo do exoma através de técnicas de sequenciamento de nova geração.

Pergunta: Diante dos recentes avanços da biologia molecular e mais especificamente das novas técnicas de sequenciamento de DNA, exames complementares tem despontado para incrementar a investigação etiológica da deficiência intelectual inespecífica, dentre eles, o sequenciamento completo do exoma, é neste contexto que elaboramos a nossa pergunta: Há evidência científica de acurácia diagnóstica do sequenciamento completo do exoma para deficiência intelectual inespecífica?

Busca e análise de evidências científicas: Foram feitas buscas de artigos científicos com os descritores relacionados à “deficiência intelectual”, “exoma” e “diagnóstico” nas bases de dados do PubMed, LILACS, CRD, The Cochrane Library e EMBASE.

Resumo dos resultados dos estudos selecionados: Selecionamos e analisamos sete estudos sobre o tema, de acordo com esses artigos, há evidências indiretas a respeito da acurácia do exoma como teste diagnóstico para investigação etiológica de deficiência intelectual inespecífica, porém ainda não é possível recomendá-lo como teste diagnóstico de primeira linha.

Recomendações:

- Recomendação forte a favor da tecnologia
- Recomendação fraca a favor da tecnologia
- Recomendação fraca contra a tecnologia
- Recomendação forte contra a tecnologia

Intellectual disability, also known as mental retardation, is defined by significant limitations of intellectual functioning and adaptive behavior, with onset before 18 years of age. This clinical condition is characterized by its etiological heterogeneity and its diagnostic investigation is often complex. After recent advances in molecular biology and particularly after the new technologies of DNA sequencing, additional genetic tests have emerged to improve the diagnosis of nonspecific intellectual disability, among them the whole exome sequencing (which is a small fraction of the whole genome). Nowadays chromosomal microarrays are recommended as standard first tier genetic testing, but after the advent of Next Generation Sequencing, genomic medicine has proven to be an important diagnostic tool especially for genetically heterogeneous disorders. In this context, we searched for scientific evidence of the diagnostic accuracy of whole exome sequencing used for non-syndromic intellectual disability. We selected and analyzed seven studies about this subject and according to these articles there is indirect evidence about the accuracy of the exome as a diagnostic test for nonspecific intellectual disability, however we cannot recommend it as a first line diagnostic test.

	Pág.
RESUMO EXECUTIVO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE QUADRO, FIGURA, GRÁFICO E FLUXOGRAMA.....	VIII
CONTEXTO.....	1
PERGUNTA NO FORMATO PICO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA.....	8
ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	10
SELEÇÃO DOS ARTIGOS.....	12
DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS.....	13
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA EVIDÊNCIA.....	17
DISCUSSÃO.....	19
RECOMENDAÇÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
ANEXO 1.....	27
ANEXO 2.....	30

LISTA DE TABELA, QUADRO, FIGURA, GRÁFICOS E FLUXOGRAMA

TABELA

		Pág.
Tabela 1	Resumo dos resultados dos artigos analisados.....	16

QUADRO

		Pág.
Quadro 1	Quadro final que resume a estratégia de busca usada nas diversas bases de dados.....	10
Quadro 2	Quadro inicial que resume a estratégia de busca usada nas diversas bases de dados.....	11

FIGURA

		Pág.
Figura 1	Representação esquemática do exoma em comparação com o genoma humano.....	8

GRÁFICO

		Pág.
Gráfico 1	Queda de custo por megabase de DNA sequenciada.....	6

FLUXOGRAMA

		Pág.
Fluxograma 1	Fluxograma demonstrando a seleção dos artigos.....	12

Uma vez diagnosticados clinicamente, os casos de deficiência intelectual inespecífica costumam apresentar uma investigação etiológica complexa e onerosa dada a inespecificidade clínica desta condição associada a sua ampla heterogeneidade etiológica.

Do ponto de vista da investigação das causas genéticas da deficiência intelectual inespecífica, até meados da década de 90, os exames complementares para elucidação diagnóstica estavam restritos a técnicas de citogenética clássica (como o cariótipo convencional por bandamento G), após esta data abordagens genômicas de melhor resolução (como “Chromosomal Microarray”) foram incorporadas como teste diagnóstico para esses pacientes, incrementando em até 10 vezes o sucesso diagnóstico dos casos de deficiência intelectual inespecífica.

A partir do lançamento comercial das plataformas de seqüenciamento de nova geração do DNA, a medicina genômica tem se mostrado uma importante ferramenta diagnóstica para condições geneticamente heterogêneas e sobretudo o seqüenciamento completo do exoma assumiu posição de destaque, inicialmente no âmbito de pesquisa e posteriormente na prática clínica, como teste genético para investigação dos casos de deficiência intelectual inespecífica.

É válido ressaltar, que mesmo após o uso de todos os exames complementares que estavam disponíveis até então, como cariótipo, teste molecular para síndrome do X frágil, testes metabólicos, “chromosomal microarray”, a maioria dos pacientes com déficit intelectual inespecífico continuam sem um diagnóstico estabelecido e seus familiares sem aconselhamento genético adequado. O exoma surge então para agregar esta investigação e diante das atuais dificuldades diagnósticas, mesmo sem ter sua acurácia devidamente avaliada e sem ter sido incorporado como teste diagnóstico pela ANS ou pelo SUS, rapidamente este exame ganha espaço na prática clínica dos geneticistas, neurologistas e pediatras, tanto no cenário da saúde suplementar (via judicialização ou acordos com operadoras de saúde, ou mesmo com os próprios familiares custeando o exame), quanto no Sistema Único de Saúde (via projetos de pesquisa).

Sendo assim, este estudo foi proposto no contexto contemporâneo de avanços na medicina genômica e preocupação com a eficiência alocativa de recursos nos sistemas de saúde público e privado, levando em consideração a recém publicada Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, na tentativa de reunir e analisar evidências científicas do uso do sequenciamento completo do exoma em comparação aos ensaios por microarranjos para investigação diagnóstica dos indivíduos com deficiência intelectual inespecífica, posto que o barateamento das tecnologias do sequenciamento de nova geração propiciou a utilização clínica das abordagens diagnósticas genômicas, entretanto as mesmas não foram avaliadas no que diz respeito à acurácia.

PERGUNTA NO FORMATO PICO

Há evidência científica de maior acurácia diagnóstica do sequenciamento completo do exoma para deficiência intelectual inespecífica em comparação ao uso dos ensaios por microarranjos?

P: pacientes com deficiência intelectual inespecífica

I: sequenciamento completo do exoma

C: Ensaios por microarranjos (“microarray”)

O: acurácia diagnóstica / caso diagnosticado

Deficiência intelectual, anteriormente denominada retardo mental, é uma condição etiologicamente heterogênea e clinicamente definida por limitações significativas do funcionamento intelectual e do comportamento adaptativo (incluindo autocuidados, atividades práticas e habilidades sociais) iniciadas durante o período de desenvolvimento neuropsicomotor do indivíduo (antes dos 18 anos)¹⁻⁶. A prevalência da deficiência intelectual na população geral varia de 1 a 2%, sendo mais alta nos países em desenvolvimento e no sexo masculino e mais baixa nos países desenvolvidos e no sexo feminino^{4,5}.

O diagnóstico de deficiência intelectual é clínico-social; sendo classificada em leve, moderada, grave e profunda, de acordo com o coeficiente intelectual e do funcionamento adaptativo dos indivíduos^{6,7}.

Ao contrário do diagnóstico clínico da deficiência intelectual, que muitas vezes é dado sem muita dificuldade, a investigação do diagnóstico etiológico costuma ser complexa dada a sua heterogeneidade etiológica, além dos determinantes genéticos, vários agentes teratogênicos estão implicados nas causas da deficiência intelectual, como álcool etílico, agentes infecciosos, lesões disruptivas (como defeitos congênitos do sistema nervoso central), os quais apesar de serem congênitos, não necessariamente são geneticamente determinados. Mesmo ao considerarmos apenas as causas genéticas de deficiência intelectual, é um desafio estabelecer um diagnóstico etiológico, sobretudo quando não é possível identificar um quadro sindrômico específico^{7,8,9}, visto que o déficit intelectual pode ser secundário a aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais, microdeleções ou microduplicações (desbalanços cromossômicos), defeitos gênicos (monogênicos ou oligogênicos) ou mesmo resultar da interação de fatores ambientais e genéticos, como acontece comumente nas doenças complexas de herança multifatorial^{7,10,11}.

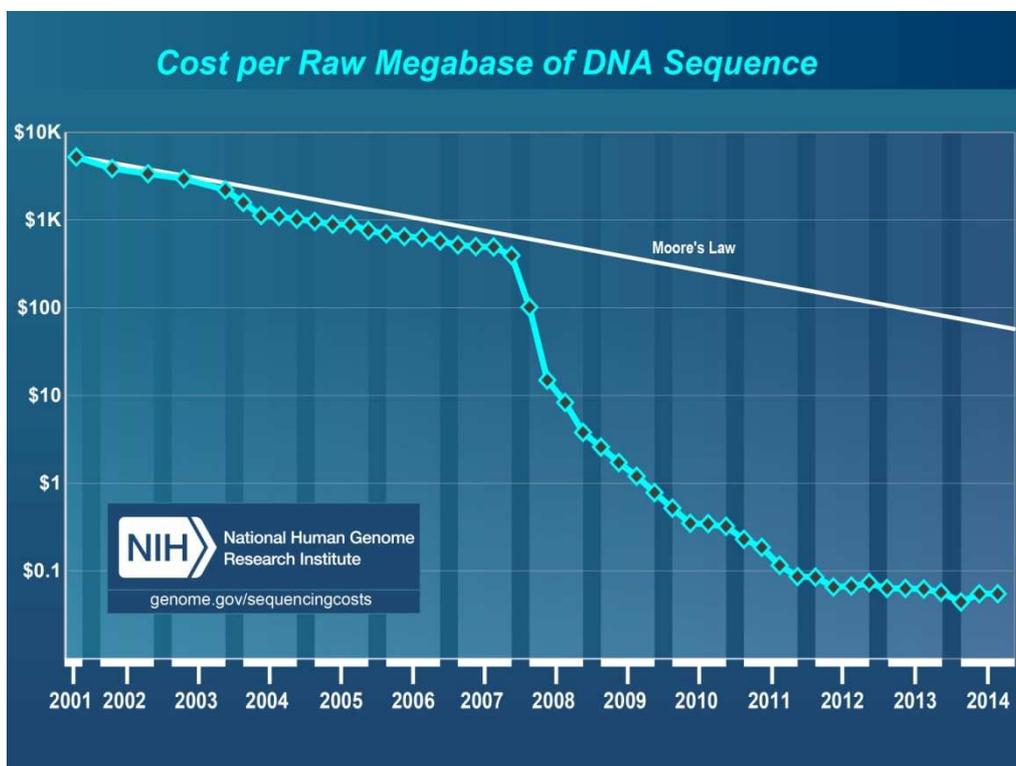
Nas condições geneticamente determinadas, a deficiência intelectual pode ocorrer de forma isolada ou fazer parte de um quadro sindrômico, ou seja, além do déficit intelectual, o indivíduo apresenta outros sinais clínicos que em conjunto configuram um diagnóstico específico ou um quadro clínico específico, como por

exemplo, ocorre na síndrome de Down ou trissomia do 21, que além do déficit intelectual o paciente apresenta sinais dismórficos faciais que sugerem um diagnóstico específico^{7,12}. Em ambos os casos, seja deficiência intelectual não síndrômica ou síndrômica, há um impacto social negativo tanto para os acometidos, quanto para seus familiares^{13,14,15}. Esclarecer o diagnóstico para esses indivíduos representa diminuição da ansiedade para os familiares e cuidadores, além da possibilidade do estabelecimento de conduta antecipatória, informações a respeito de prognóstico e a oferta de aconselhamento genético para o propósito e familiares¹⁵.

Do ponto de vista da investigação da etiologia genética, é consenso na literatura médica para casos de déficit intelectual não síndrômico ou inespecífico, utilizar como teste genético de primeira linha os ensaios por microarranjos, os chamados “microarrays” ou ainda cariótipo molecular, sendo incluídos nessa categoria o *array*-CGH, ou hibridização genômica comparativa, o SNP-*array* e a-GH, ou hibridização genômica em *arrays*)⁹⁻¹⁸. De fato, esta técnica proporciona uma cobertura ampliada do genoma, numa resolução 30 a 50 vezes superior ao oferecido pelo cariótipo convencional. Contudo, a maioria dos casos de deficiência intelectual inespecífica continua sem diagnóstico etiológico^{7,9,12,14,15,19,20,21}, posto que os “microarrays” diagnosticam cerca de 10 a 20% dos casos de déficit intelectual inespecífico^{16,18,25}, frente ao cariótipo convencional (com bandamento G), o qual elucida apenas 3% desses casos¹⁶.

A partir de 2005, após o advento do sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*), ocorreu o barateamento do sequenciamento do DNA decorrente da comercialização dos sequenciadores de última geração (**Gráfico 1**), que permitem leituras com alto desempenho e geram dados massivos do genoma humano. Esta nova tecnologia propiciou que o sequenciamento completo do exoma (região codificante do genoma humano) despontasse como teste diagnóstico, extrapolando o contexto de pesquisa, ao qual estava restrito, devido ao seu alto custo inicial²⁶⁻³⁰. Este método tem sido aplicado cada vez mais na prática clínica como ferramenta diagnóstica, sobretudo para os quadros clínicos inespecíficos, de herança monogênica presumida (na qual há um único gene envolvido na doença), ou com grande heterogeneidade genética (múltiplos genes responsáveis pelo mesmo quadro clínico), diante dos quais é difícil estabelecer um único gene candidato para ser testado.

Nessas ocasiões utilizar formas “multiplexadas” de testes genéticos, ao invés de testar vários genes em série, tem se mostrado uma estratégia interessante.



Fonte: <http://www.genome.gov/images/content/cost>

Gráfico 1- Queda de custo por megabase de DNA sequenciada.

Algumas publicações sugerem que o sequenciamento completo do exoma deve substituir os ensaios por microarranjos como teste de primeira linha³¹. Até o presente momento, estes testes têm sido usados em série, de forma sequencial, diante da ausência de mutações causais que possam esclarecer o diagnóstico com o uso do “microarray”, ou seja, quando o resultado do teste é negativo, emprega-se o sequenciamento completo do exoma. É válido ressaltar que os dois exames não necessariamente se sobrepõem, já que o exoma apresenta resultados predominantemente qualitativos e se concentra na análise das regiões codificantes do genoma, enquanto os ensaios por microarranjos apresentam uma cobertura mais ampliada e distribuída em todo o genoma, e oferecem resultados predominantemente quantitativos. Contudo há uma sobreposição ainda de magnitude indeterminada entre os dois exames, como é comum nas novas tecnologias que surgem na área médica^{14,31}.

É válido ressaltar que apesar da associação de diversas abordagens diagnósticas, incluindo ensaios por microarranjos e sequenciamento do exoma, a causa da deficiência intelectual inespecífica continua sem esclarecimento em 60 a 80% dos casos^{8, 12}. Ao considerarmos apenas os casos de déficit intelectual grave, nos quais há maior chance do achado de um defeito genético causal, a taxa diagnóstica é de 42% após o sequenciamento completo do genoma, a técnica mais sensível disponível no momento, visto que sequencia virtualmente todo o genoma humano²⁵.

Recentemente no Brasil, a ANS (Agência Nacional de Saúde Suplementar) incorporou como método complementar de diagnóstico, com diretriz de utilização, o “microarray” para casos de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor ou deficiência intelectual, mas este teste genético não foi incorporado como exame diagnóstico de primeira linha, sendo exigido o cariótipo convencional, além de outros critérios clínicos³². Tal restrição ao uso do “microarray” aparentemente não embasada em evidência científica vai de encontro ao que está sendo defendido pela literatura médica^{7,11,15,16,18,19}.

No âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde), a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras³³, oficializada pela Portaria Nº 199, de 30 de janeiro de 2014, publicada pelo Ministério da Saúde, prevê a realização de microarray para investigação etiológica de condições clínicas que envolvem deficiência intelectual. Contudo, tanto o sistema público brasileiro, quanto o privado ainda não consideram a possibilidade de utilizar o sequenciamento completo do exoma como exame diagnóstico, de forma sistemática. Este teste vem sendo custeado pelas próprias famílias dos pacientes, sem uma contrapartida dos sistemas de saúde, ou quando há este tipo de contrapartida, geralmente é via judicialização.

Diante das atuais perspectivas dos testes genômicos e das potenciais vantagens do uso do sequenciamento do exoma frente aos ensaios por microarranjos, como exame de primeira linha, o presente estudo tem como objetivo buscar as evidências disponíveis da acurácia diagnóstica do sequenciamento completo do exoma em comparação aos ensaios por microarranjos para pacientes com deficiência intelectual inespecífica.

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA

O material genético humano, ou genoma humano, é composto por DNA, ou ácido desoxirribonucleico como é denominada sua estrutura química, organizado em dupla fita espiralada, distribuído tanto no núcleo celular (DNA nuclear), quanto dentro das mitocôndrias (DNA mitocondrial). O exoma é uma diminuta porção do genoma humano (**Figura 1**), que corresponde ao conjunto de todos os éxons do genoma, isto é, a porção codificante do genoma, ou ainda, a região do DNA que de fato é traduzida em proteínas. Quantitativamente o exoma responde por menos de 2% do genoma humano, mas é nesta pequena porção do DNA que se concentra a maioria das mutações com potencial patogênico e que são responsáveis pelas doenças determinadas geneticamente^{27,28}.

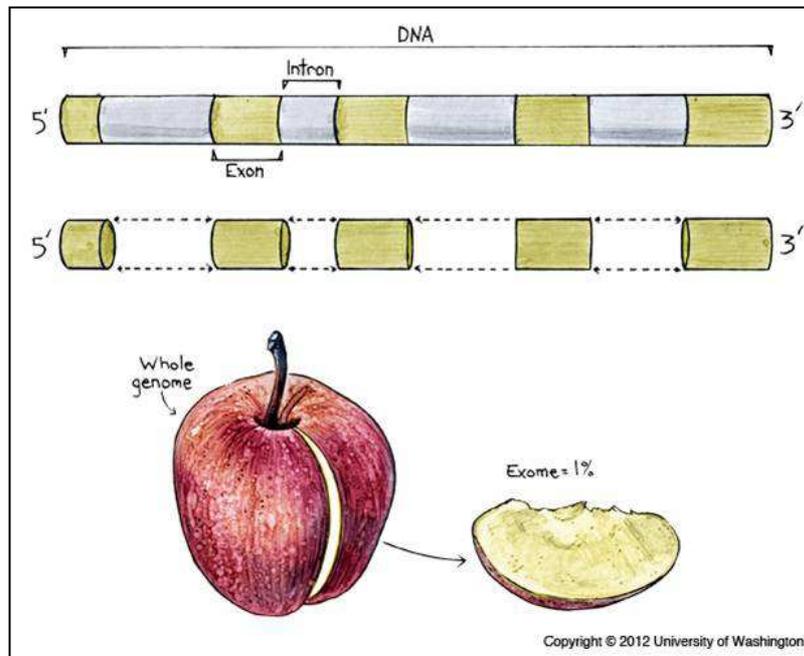


Figura 1- Representação esquemática do exoma em comparação com o genoma

humano.

O sequenciamento do DNA, ou melhor, a determinação da sequência de suas bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina ou timina) iniciou com um processo artesanal, descrito por Sanger²⁸; este método de eletroforese capilar para sequenciamento de DNA foi automatizado em meados de 1970, o que permitiu seu uso em larga escala e a elucidação de várias condições clínicas de base genética, de maneira que foi e ainda é de grande valia para a medicina³⁴.

A partir de 2005, começaram a ser comercializadas, sobretudo em contexto de pesquisa, as novas plataformas de sequenciamento de DNA, providas de uma nova e mais eficiente tecnologia (sequenciamento de nova geração - *Next Generation Sequencing*) baseadas em sua maioria em clonagem *in vitro*, suporte sólido de sequenciamento e pirosequenciamento, abandonando a eletroforese em gel para separação de fragmentos e outras etapas laboriosas do processo de sequenciamento pelo método de Sanger^{27,28,34}.

Estas novas plataformas representadas pela 454 FLX da Roche, *Solexa da Illumina*, *SOLid System da Applied Biosystems*, *Ion Torrent da Life Technologies*, dentre outras, utilizam métodos diferentes do usado no sequenciamento convencional ou de Sanger, e diferem entre si do ponto de vista de tecnologia de sequenciamento, mas possuem características em comum que serão ressaltadas e em conjunto, as colocam em uma categoria de maior eficiência - o sequenciamento de nova geração^{29,35}.

Apesar de competirem comercialmente e de serem distintos metodologicamente, os sequenciadores de nova geração compartilham algumas características tecnológicas e geram informações massivas a respeito da sequência do DNA. Enquanto o sequenciamento pelo método de Sanger gera informações no nível de centenas de pares de base, o sequenciamento de nova geração é capaz de fornecer leitura de milhares de pares de base em uma única reação (corrida). Desta forma, com esta nova tecnologia é possível sequenciar vários genes em paralelo, o exoma inteiro, ou todo o genoma em uma única corrida; ao passo que com o sequenciamento por Sanger apenas é possível obter informações de fragmentos de genes²⁹.

Uma descrição mais detalhada do sequenciamento de nova geração está disponível no **Anexo 1**.

ESTRATÉGIA DE BUSCA

Para compor o corpo da evidência científica buscamos estudos originais, contendo dados primários do uso diagnóstico do sequenciamento completo do exoma e “microarray” em pacientes com deficiência intelectual inespecífica ou não sindrômica. Consideramos como desfecho o estabelecimento do diagnóstico através deste teste diagnóstico, independentemente do tipo de mutação encontrada. As buscas foram feitas nas bases de dados do PubMed, The Cochrane Library, Lilacs, CRD e EMBASE, os descritores usados em cada plataforma estão detalhadamente discriminados no quadro 1.

A última revisão da busca foi realizada em 15/01/2015 e não houve restrição idiomática ou limitação no que diz respeito à data de publicação do artigo, ou grau da deficiência intelectual, ou idade dos pacientes.

Quadro 1- Quadro resumo da estratégia de busca usada nas diversas bases de dados, considerar o operador booleano OR dentro das células e AND entre as células de uma mesma linha. Na última coluna está discriminada a quantidade de estudos em 15/01/15.

Descritores	Deficiência intelectual Ou Retardo mental	Sequenciamento completo do exoma Ou Exoma	Diagnóstico Ou Acurácia diagnóstica	Estudos encontrados
PubMed-MeSH	Intellectual disability OR Mental retardation	Exome	Diagnosis	146
LILACS (BIREME) – DeCS	Intellectual disability	Exome	Diagnosis	0
CRD	Intellectual disability	Exome	Diagnosis	1
The Cochrane Library	Intellectual disability	Exome	Diagnosis	0
EMBASE - Emtree	Intellectual impairment OR Mental deficiency	Exome OR Exome Sequencing	Diagnostic accuracy OR Diagnosis	339

NCBI-PubMed: (“Intellectual Disability” OR “Mental retardation”) AND (“Exome”) AND “Diagnosis”

EMBASE: (“Intellectual Impairment” OR “Mental deficiency”) AND (“Exome” OR “Exome Sequencing”) AND (“Diagnostic Accuracy” OR “Diagnosis”).

Center for Review and Dissemination (CRD): “Intellectual disability” AND “exome” AND “diagnosis”

LILASCS: “Intellectual disability” AND “exome” AND “diagnosis”

THE COCHRANE LIBRARY: “Intellectual disability” AND “exome” AND “diagnosis”

A busca supracitada também foi feita agregando os termos “microarray analysis”, “chromosomal microarray” e “Oligonucleotide array sequence analysis” (**Quadro 2**), que seria o comparador, ou referência, ou o teste-padrão, mas essa estratégia de busca não resultou em nenhum artigo científico e como nosso objetivo é avaliar a melhor evidência disponível da acurácia diagnóstica do uso do exoma para o diagnóstico de deficiência intelectual, abrimos mão da comparação direta dessas duas estratégias, o que seria o estudo metodologicamente ideal, em detrimento de avaliar o que há disponível hoje na literatura médica a respeito do assunto.

Quadro 2- Quadro resumo da estratégia de busca proposta inicialmente nas diversas bases de dados, considerar o operador booleano OR dentro das células e AND entre as células de uma mesma linha. Na última coluna está discriminada a quantidade de estudos em 15/01/15.

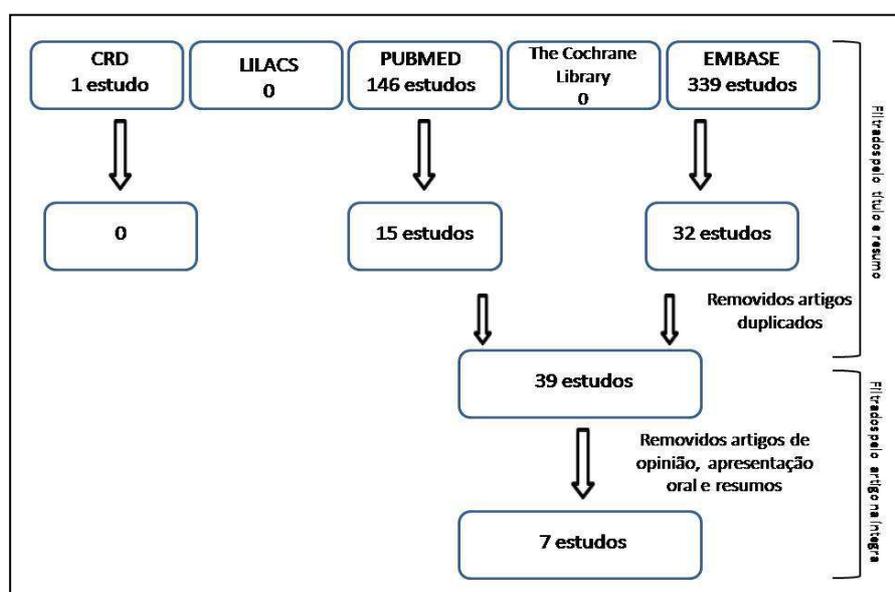
Descritores	Deficiência intelectual Ou Retardo mental	Sequenciamento completo do exoma Ou Exoma	Ensaio por microarranjos	Diagnóstico Ou Acurácia diagnóstica	Estudos encontrados
PubMed-MeSH	Intellectual disability OR Mental retardation	Exome	Microarray analysis	Diagnosis	0
LILACS (BIREME) – DeCS	Intellectual disability	Exome	Microarray analysis OR Oligonucleotide array sequence analysis	Diagnosis	0
CRD	Intellectual disability	Exome	Chromosomal microarray	Diagnosis	0
The Cochrane Library	Intellectual disability	Exome	Microarray analysis OR Oligonucleotide array sequence analysis	Diagnosis	0
EMBASE - Emtree	Intellectual impairment OR Mental deficiency	Exome OR Exome Sequencing	Chromosomal microarray	Diagnostic accuracy OR Diagnosis	0

SELEÇÃO DOS ARTIGOS

A busca inicial resultou em 146 artigos científicos no PubMed, um único artigo na base de dados CRD e 339 estudos oriundos do EMBASE. Não foram identificados estudos, relacionados ao tema, a partir das plataformas LILACS e The Cochrane Library.

Inicialmente foram excluídos pelo título e resumo do artigo os estudos com abordagem doença-específica ou gene específica, pois os mesmos se limitam a um diagnóstico específico (**Fluxograma 1**), que não o de deficiência intelectual inespecífica. Também foram removidos artigos que fogem do tema como os que tratam de diagnóstico fetal ou pré-natal, os estudos em modelo animal e os não relacionados com deficiência intelectual.

Após este primeiro filtro restaram 47 artigos científicos provenientes das plataformas EMBASE e PubMed, dos quais oito estavam duplicados nas duas bases de dados. Os 39 estudos restantes (**Anexo 2**) foram lidos na íntegra e foram eliminados os artigos de opinião, que trazem uma reflexão sobre o tema e os de revisão descritiva, que não trazem dados primários; também foram retirados os resumos e as apresentações orais. Enfim, ficamos com sete artigos publicados a partir de 2012.



Fluxograma 1- Fluxograma demonstrando a seleção dos artigos.

DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos artigos selecionados estão resumidos na tabela 1 e descritos abaixo.

Rauch et al, 2012¹⁹

Rauch e colaboradores conduziram entre o período de fevereiro a novembro de 2011 um estudo caso-controle, que recrutou 51 crianças, sendo 32 do sexo feminino e 19 do sexo masculino, provenientes da Alemanha e Suíça com deficiência intelectual grave, cujos pais eram pais hígidos e não consanguíneos. Todos os casos tinham diagnóstico clínico de déficit intelectual não síndrômico e 48 deles apresentaram Q.I. abaixo de 60; os pacientes já tinham sido previamente submetidos a investigação diagnóstica com cariótipo molecular com resultado dentro da normalidade. Como controle populacional, foram recrutados 20 trios (caso índice e seus respectivos pais) de pacientes diabéticos, totalizando 60 controles sem déficit intelectual. Os pais dos afetados também foram considerados controles familiar e ao todo, foram sequenciados 213 exomas (51 casos + 102 pais dos afetados; 20 controles + 40 pais dos controles) através do sequenciador HiSeq 2000 com cerca de 90% dos nucleotídeos com uma cobertura de pelo menos 20X. A sensibilidade estimada para detecção de cada nucleotídeo foi de 97,5%. Dos 51 casos, 16 pacientes apresentaram mutação nova, em genes sabidamente envolvidos com retardo mental. Entretanto duas mutações foram consideradas benignas e outras duas também não puderam ser implicadas com o diagnóstico de deficiência intelectual, de forma que em 12 dos 51 casos (23,5%) foi encontrada uma mutação causal que provavelmente está relacionada ao diagnóstico de deficiência intelectual não síndrômica.

Athanasakis et al, 2013³⁶

Neste estudo, os autores fizeram sequenciamento completo do exoma de nove pacientes com diagnóstico de deficiência intelectual não síndrômica de leve a moderada. Esses nove casos foram selecionados de uma coorte de 236 pacientes com déficit intelectual, dos quais 57 casos tiveram seu diagnóstico

elucidado através de SNP Array, dentre os 179 restantes, foram considerados critérios de inclusão para realização do exoma, cariótipo normal, teste molecular para síndrome do X frágil negativa e ausência de CNV's patológicas detectadas ao SNP array. O sequenciamento do exoma foi realizado através da plataforma Illumina HiScanSQ com o kit comercial Tru Seq Exome Enrichment de 62Mb e cobertura média de 31 vezes. Dos 9 casos selecionados, três (33,33%) tiveram seu diagnóstico esclarecido (com mutações causais identificadas) após o uso do exoma.

Hamdam et al, 2014³⁷

Os autores sequenciaram o exoma de 41 indivíduos (18 do sexo masculino e 23 do sexo feminino), bem como de seus pais (não afetados). Todos os pacientes, recrutados após diagnóstico de déficit intelectual moderado ou grave, tinham resultado de hibridização genômica comparativa normal e não apresentavam sinais clínicos que sugerissem um quadro sindrômico. Os exomas foram sequenciados através do Illumina HiSeq2000. Em 12 dos 41 indivíduos estudados foram encontradas mutações novas em genes sabidamente envolvidos com deficiência intelectual, as quais foram consideradas responsáveis pelo diagnóstico de déficit intelectual (29%).

Helsmoortel et al, 2014⁹

Neste estudo foram selecionados dez pacientes com déficit intelectual inespecífico de leve a grave e sem diagnóstico molecular confirmado (previamente submetidos ao cariótipo convencional, SNP-array e teste molecular para síndrome do X frágil). O sequenciamento completo do exoma foi feito através do HiSeq 2000 (Illumina) com cobertura média de 92X e três mutações causais distintas foram detectada em 3 indivíduos estudados (30% dos casos diagnosticados através do exoma).

Willemsen et al, 2014¹⁴

Os autores avaliaram uma série de 253 pacientes com diagnóstico de deficiência intelectual sem etiologia definida. O estudo foi dividido em duas fases: A primeira fase denominada "Fase diagnóstica" e uma segunda fase chamada

“Fase de pesquisa relacionada ao diagnóstico”. A primeira fase incluiu avaliação clínica e testes genéticos usados rotineiramente (microarray, testes metabólicos, teste molecular para Síndrome do X frágil). Nesta primeira fase do estudo o diagnóstico foi elucidado em 43 indivíduos (18,4%) dentre 234 testados. Na segunda fase, apenas 42 trios (caso índice + pais) tiveram seu exoma sequenciado, dentre eles, 14 indivíduos afetados tiveram o diagnóstico estabelecido através da identificação de mutações novas (33,3%).

Ligt et al, 2012²⁰

Os autores avaliaram cem pacientes (53 mulheres e 47 homens) com déficit intelectual grave (Q.I. abaixo de 50) e seus respectivos pais não afetados; todos os pacientes foram submetidos a avaliação genético-clínica e extensiva investigação propedêutica complementar (inclusive com SNP array e testes metabólicos) e todos permaneceram sem diagnóstico etiológico. Cada trio teve seu exoma sequenciado através do SOLiD 4 System e 79 mutações novas foram identificadas, das quais 16 eram sinônimas (sem relevância clínica) e 63 eram não-sinônimas. Dentre as 63, apenas 13 foram descritas em genes sabidamente envolvidos com deficiência intelectual e foram consideradas causais. Outras 3 mutações novas em genes candidatos para déficit intelectual foram posteriormente implicadas no diagnóstico (a partir de uma série de 765 casos de déficit intelectual que confirmou os achados dos genes candidatos em outros pacientes com déficit intelectual). Sendo assim, dos cem casos analisados, o diagnóstico foi dado em 16 % deles pela da realização do sequenciamento completo do exoma.

Ligt et al, 2013³¹

Neste trabalho o autor sequenciou o exoma de dez indivíduos com deficiência intelectual sabidamente com ao menos uma alteração do tipo CNV (copy number variation) detectadas através de SNP-array. Ao todo, os dez indivíduos possuíam 12 CNVs patológicas. O estudo tinha como objetivo investigar o potencial diagnóstico do exoma em detectar CNV com diferentes algoritmos analíticos.

Onze dos 12 CNVs clinicamente relevantes foram detectados pelo sequenciamento completo do exoma (88,8% das variantes foram identificadas pelo novo método).

Tabela 1- Resumo dos resultados dos artigos analisados.

Estudos analisados	Número total de casos testados por exoma	Número de casos diagnosticados
Rauch et al, 2012	51	12 (23,5%)
Athanasakis, et al 2013	9	3 (33,3%)
Hamdam, et al 2014	41	12 (29,3%)
Helsmoortel, et al 2014	10	3 (30%)
Willemsen, et al 2014	42	14 (33,3%)
Ligt et al, 2012	100	16 (16%)

Obs. O estudo de Ligt et al, 2013 não foi incluído na tabela pois todos os pacientes que foram testados por exoma, sabidamente já apresentaram alteração ao microarray.

Dos sete artigos analisados, todos são observacionais, do tipo coorte clínica, série de casos, ou ainda caso-controle, com baixa qualidade de evidência de acordo com o GRADE³⁸. A maioria desses estudos não foi desenhada para medir o desempenho do teste, ou a acurácia diagnóstica em termos de sensibilidade e especificidade. Nenhum trabalho citado aplica o teste diagnóstico avaliado (exoma) em paralelo com o teste padrão de referência (array-CGH ou SNP array). Ao contrário, todos os estudos aplicam os testes em série, isto é, o sequenciamento do exoma só é realizado nos indivíduos que apresentaram ensaio por microarranjos dentro da normalidade. Este tipo de abordagem não fornece os dados necessários para preencher a tabela de contingência 2 X 2, sendo assim, não é possível calcular os valores de sensibilidade e especificidade para o novo teste. O único artigo³¹ que aplica o exoma em indivíduos com resultado alterado no teste padrão, não descreve a aplicação do teste para o grupo que teve o resultado normal.

Outra questão metodológica difícil de ser harmonizada é a variedade de sequenciadores e plataformas usadas em cada estudo; a resolução e a cobertura do sequenciamento também podem ser fontes de variação inerentes à execução do teste e nem sempre são devidamente descritas nos artigos. Os algoritmos analíticos igualmente diferem entre si e potencialmente são capazes de modificar o resultado final do teste.

Todos os artigos analisados têm um número amostral relativamente pequeno, ao considerarmos uma condição clínica que não é rara (prevalência maior que 1% na população geral), ao contrário da maioria das condições determinadas geneticamente. O estudo com maior número de pacientes foi conduzido por Ligt e colaboradores (n=100) e selecionou apenas indivíduos com deficiência intelectual grave, este estudo foi o que proporcionalmente diagnosticou o menor número de casos (16%). A seleção de pacientes com deficiência intelectual grave pode gerar um viés amostral em potencial, uma vez que quanto mais grave o grau da deficiência intelectual, em teoria, maior é a chance de se achar um determinante genético para esses casos – o que poderia favorecer a tecnologia em estudo, entretanto este foi o estudo com a menor taxa diagnóstica.

Diante dessas falhas metodológicas dos artigos que compõem o corpo da evidência deste estudo secundário, consideramos que o nível das evidências encontradas é baixo.

Como nenhum estudo demonstrou uma comparação direta entre os dois testes diagnósticos, ou seja, a partir dos estudos analisados não foi possível comparar integralmente o teste padrão (“microarray”) com o novo teste diagnóstico (exoma), parcialmente este fato pode ser explicado por uma questão temporal, quando o exoma surgiu para uso diagnóstico, o “microarray” já vinha sendo amplamente empregado, de maneira que partiram para investigação com exoma apenas os pacientes que ainda não tinham elucidação diagnóstica com o “microarray”, então é prudente ressaltar que a evidência existente a favor do uso diagnóstico do exoma para investigação de déficit intelectual é indireta, o que diminui a força da recomendação a favor da nova tecnologia.

Entretanto, apesar de não ser possível estimar a magnitude do efeito, através da valoração da acurácia, vale salientar que todos os estudos são favoráveis ao uso diagnóstico do exoma para deficiência intelectual e a maioria deles o utilizam diante de um resultado de ensaio por microarranjos normal, salvo pelo trabalho de De Ligt 2013 que sugere o uso do exoma como teste de primeira linha para investigação de deficiência intelectual.

Uma importante característica favorável ao exoma é que o dado bruto gerado (a sequência propriamente dita), isto é, o resultado do exame pode ser revisitado, reanalisado e reinterpretado à medida que o conhecimento médico evolui. Neste teste não há um desfecho dicotômico (“positivo ou negativo”), mas sim uma lista de variantes, que podem não elucidar o diagnóstico no primeiro momento, mas posteriormente variantes de significado incerto podem assumir um valor patológico ou benigno. O resultado do exoma é potencialmente dinâmico e a acurácia diagnóstica pode aumentar na medida em que o conhecimento da genética médica se consolida, além do que, graças à possibilidade da reinterpretação do exame, evita-se uma nova coleta e o custo da realização de um novo procedimento.

Outro ponto que deve ser considerado antes de se incorporar este teste, diz respeito às questões éticas inerentes à medicina genômica. Conforme dito anteriormente, o exoma é apenas uma ferramenta diagnóstica e sua utilidade não está

restrita aos casos de deficiência intelectual, mas pode ser de grande valia na elucidação de qualquer condição de etiologia genética (não cromossômica), inclusive para uma doença que ainda não se expressou clinicamente, mas para a qual existe a determinação genética no indivíduo. Esses achados que não necessariamente estão relacionados com o diagnóstico principal (motivo pelo qual o exame foi feito), mas que podem constar no resultado do exame chamamos de achados incidentais ou secundários³⁹. Os achados incidentais dos testes genéticos são fontes de polêmica, pois alguns diagnósticos genéticos são passíveis de uma intervenção médica terapêutica, no entanto, muitos desses achados secundários não o são, e podem representar um transtorno ao paciente e a seus familiares o simples fato de ter aquela informação precocemente, sem que nada possa ser feito para evitar o curso da doença^{39,40,41}. Sendo assim, a forma de transmitir os achados incidentais dos testes genéticos para os pacientes e seus familiares ainda está em ampla discussão na comunidade científica^{40,41,42,43}.

Esta nova tecnologia representa não somente uma vantagem em termos de acurácia diagnóstica para deficiência intelectual, mas uma verdadeira quebra de paradigma para a genética médica, à medida que permite testar paralela e qualitativamente vários genes de um mesmo indivíduo, o que é particularmente útil nos casos em que não há um achado clínico que evoque um diagnóstico específico, como ocorre na deficiência intelectual inespecífica. Enfim, trata-se de um único exame disponível para distintas condições clínicas que tem revolucionado as perspectivas médico-diagnósticas ao redor do mundo.

Quanto ao uso do exoma no início ou no fim da investigação diagnóstica, se ele deve ser usado antes ou depois dos ensaios por microarranjos, se devemos assumi-lo como teste diagnóstico de primeira linha para os casos de deficiência intelectual inespecífica, são questões ainda em aberto, mesmo levando em consideração a melhor evidência disponível no momento. Sugerimos um estudo de acurácia e em seguida de custo-efetividade que realize os dois exames (exoma e ensaio por microarranjos) nos mesmos indivíduos, paralelamente e independentemente dos resultados e calcule os custos dos dois procedimentos, para que seja possível estabelecer em que ordem devem ser aplicados. É importante ainda ressaltar a importância de se realizar estudos de microcusteio de ambos os testes diagnósticos no cenário nacional, uma vez que não há dados referentes aos custos desses procedimentos em nosso país e os raros estudos internacionais não refletem a nossa realidade. Apesar do exoma e dos ensaios por microarranjos já estarem disponível comercialmente no Brasil, temos

apenas o preço final praticado ao consumidor, o que sabidamente não corresponde aos custos dos exames.

Diante da complexidade da investigação etiológica da deficiência intelectual inespecífica, do efeito deletério da ausência do diagnóstico para familiares e cuidadores, da possibilidade de oferecer aconselhamento genético para os familiares interessados após o estabelecimento do diagnóstico (considerada uma externalidade positiva intangível) e ainda considerando as evidências disponíveis no momento e o barateamento desta nova tecnologia propiciado pelo sequenciamento de nova geração, recomendamos o uso diagnóstico do exoma para deficiência intelectual inespecífica (nível da recomendação fraca).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tassé M. Whast's in a Name? Intellectual and developmental disabilities. Abr. 2013;v.51, n.2,p.113-6.
2. Shalock R, et al. The renaming of mental retardation: Understanding the change to the term intellectual disability. Intellectual and developmental disabilities. Abr. 2007; v.45, n.2,p.116-24.
3. Tassé M, et al. AAIDD Proposed Recommendations for *ICD-11* and the Condition Previously Known as Mental Retardation. Intellectual and developmental disabilities. Abr, 2013;v.51, n.2,p.127-31.
4. Salvador-Carulla L. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for “mental retardation/intellectual disability” in ICD-11.
5. Papazoglou, 2014. To ID or Not to ID? Changes in Classification Rates of Intellectual Disability Using DSM-5.
6. Greenspan, 2014. Intellectual disability as a disorder of reasoning and judgement: the gradual move away from intelligence quotient-ceilings.
7. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodevelop Disord* (2010) 2:182-209.
8. Rauch A, Hoyer J, Guth S, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006; 2063-74
9. Helsmoortel C, Vanderweyer G, Ordoukhanian P, Van Nieuwerburgh F, Van der Aa N, Kooy RF. Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family-based whole-exome sequencing. *Clin Genet* 2014.
10. Roselló M, Martínez M, Monfort S, Mayo S, Oltra S, Orellana C. Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *European Journal of Paediatric Neurology* 2014.

11. Coutton C, Dietrich K, Satre V, Vieville G, Mamblard F, David M, et al. Array—CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study. 2014. *Eur J Pediatr*.
12. Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet*. 2011;80:117-26.
13. Einfeld SL, Ellis LA, Emerson E. Comorbidity of intellectual disability and mental disorder in children and adolescents: a systematic review. *J Intellect Dev Disabil*. 2011;36:137-43.
14. Willemsen MH, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet*. 2014;85:101-10.
15. Moeschler JB. Comprehensive Evaluation of the Child With Intellectual Disability or Global Developmental Delays. *Pediatrics*. Set 2014;vol 134,n. 3.
16. Miller. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. 2010.
17. Flore. Updates in the Genetic Evaluation of the Child with Global Developmental delay or Intellectual Disability. 2012.
18. Sagoo. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. 2009.
19. Rauch. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. 2012.
20. Ligt J, et al. Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability. *The New England Journal of Med*. 2012
21. Carvill GL, Mefford HC. Microdeletion syndromes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2013; 23:232-9.
22. Hamdam FF, et al. Excess of De Novo Deleterious Mutations in Genes Associated with Glutamatergic Systems in Nonsyndromic Intellectual Disability. *The American Journal of Human Genetics*. 2011;88:306-16.

23. Robinson. Whole exome sequencing for finding de novo mutations in sporadic mental retardation. 2010.
24. Vissers, et al. A *de novo* paradigm for mental retardation. Nature Genetics 2010;42:1109-112.
25. Gilissen C, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. Nature. 2014;vol 511:344-7.
26. Ku CS, et al. Exome sequencing: Dual Role as a Discovery and Diagnostic Tool. Ann Neurol. 2012;71:5-14.
27. Polychronakos C, Ku CS. Exome diagnostics: already a reality? J Med Genet 2013;48:579.
28. Majewski J, et al., 2012. What can exome sequencing do for you? J Med Genet 2011;48:580-9.
29. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing ready for the clinics? Clin Genet. 2012;81:503-10.
30. Nelen. Genome and exome sequencing in the clinic: unbiased genomic approaches with a high diagnostic yield. 2012.
31. Ligt J, et al. Detection of Clinically Relevant Copy Number Variants with Whole-Exome Sequencing. Human Mutation. 2013;34:1439-48.
32. Agência Nacional de Saúde Suplementar (Brasil). Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde: RN 338/2013 / Agência Nacional de Saúde Suplementar (Brasil).
33. Ministério da Saúde. Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. Portaria N° 199, de 30 de janeiro de 2014.
34. Bick D, Dimmock D. Whole exome and whole genome sequencing. Curr Opin Pediatr. 2011;23:594-600.
35. Metzker M. Sequencing technologies - the next generation. Nature Genetics. 2010;vol 11:31-46.

36. Athanasakis E, et al. Next Generation Sequencing in Nonsyndromic Intellectual Disability: From a Negative Molecular Karyotype to a Possible Causative Mutation Detection. *Am J Genet Part A* 2013;164A:170-6.
37. Hamdam, et al. De Novo Mutations in Moderate or Severe Intellectual Disability. *PLoS Genet.* 2014;10(10).
38. Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation - GRADE. www.gradeworkinggroup.org
39. Townsend A, et al “I want to know what’s in Pandora’s Box: Comparing Stakeholder Perspectives on Incidental Findings in Clinical Whole Genomic Sequencing”. *Am J Med Genet. Part A* 2012;158A:2519-25.
40. Biesecker LG. Incidental Variants Are Critical for Genomics. *The Am J Hum Genet.* 2013;92:648-51.
41. Christenhusz GM, Devriendt K, Peeters H, Vans Esch H, Diedrickx K. The Communication of Secondary Variants: Interviews with Parents whose Children have Undergone Array-CGH Testing. *Clin Genet.* 2014;86(3):207-16
42. Green RC, et al. ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genet Med* 2013;15(7):565-74.
43. Burke W, et al. Recommendations for returning genomic incidental findings? We need to talk! *Genet Med.* 2013;15(11):854-9.

DESCRIÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO E DA TÉCNICA DE “MICROARRAY”

O sequenciamento completo do exoma, como os demais testes de DNA, pode ser realizado a partir de sangue periférico (ou de outra amostra biológica que contenha células nucleadas), do qual se extrai o DNA genômico; a partir do DNA total, capturam-se os éxons das amostras (preparação da biblioteca). Em seguida à captura dos éxons, as bibliotecas são sequenciadas em aparelhos “*Next-Generation*”. As sequências geradas (“*reads*”) são alinhadas com o genoma de referência e as alterações candidatas são identificadas e filtradas através de ferramentas de bioinformática. Um quadro esquemático com as fases sequenciais de todo o processo está exposto a seguir (**Quadro abaixo**).

Após a amostra ser submetida ao sequenciamento de nova geração, os dados produzidos são da ordem de gigabases por corrida (reação). Geralmente, as sequências são curtas e há necessidade de *softwares* de análise com grande poder de processamento. A qualidade dos dados obtidos será inicialmente averiguada com ferramentas de bioinformática. As sequências geradas pelo equipamento são filtradas de acordo com escores de qualidade e aquelas com níveis inferiores ao estipulado são removidas. As amostras são então alinhadas ao genoma de referência com algoritmos de alto desempenho e os arquivos resultantes são convertidos para o formatos mais acessíveis para simplificar as análises subsequentes.

Diferentes algoritmos analíticos dependendo do modelo de doença estudado podem ser usados, considerando tanto os dados clínicos quanto às sequências geradas.

Como padrão-ouro para a investigação da etiologia genética dos casos de deficiência intelectual, temos os ensaios por microarranjos, esta técnica de “microarray” consiste em uma coleção de moléculas de DNA de fita única marcadas com um fluoróforo e fixas em um substrato sólido - lâmina ou chip de DNA - sobre a qual é depositada a amostra de DNA a ser testada para que ocorra uma reação de hibridação. Como as sequências das moléculas de DNA fixas na lâmina (sondas) são conhecidas e

representativas de todo o genoma, após a hibridação é feita a análise do chip por softwares específicos que identifica perdas e/ou ganhos de material genético, sendo assim, esta técnica realizada de maneira automatizada e interpretada por profissional especializado tem grande empregabilidade clínica na genética médica pois permite detectar desbalanços cromossômicos como microdeleções e microduplicações numa resolução superior ao cariótipo convencional.

Quadro- Fases básicas representativas do processo de sequenciamento de nova geração.

Extração do DNA genômico a partir de amostras de sangue periférico	Realizada através da técnica fenol-clorofórmio, kits de extração ou similar
Purificação do DNA genômico	Através de kits comerciais de purificação o DNA total é otimizado para 50ng de DNA genômico total. A taxa de absorvância 260/280nm que mede a pureza da amostra deve estar entre 1.8 e 2.0
Tagmentação do DNA genômico	O DNA genômico purificado é fragmentado e, de forma simultânea, são adicionadas sequências adaptadoras (tags) ao mesmo. Ambas as reações são catalisadas pela enzima Nextera transposoma. São adicionados 20ul de DNA genômico (2.5ng/ul) a 25ul de tampão TD e 5ul da enzima TD (enzima de tagmentação do DNA). A reação é transferida para um termociclador onde é submetida à incubação a 55°C durante cinco minutos.
Purificação do DNA genômico tagmentado	O DNA tagmentado é novamente purificado e a purificação é realizada através de esferas magnéticas com kits comerciais.
Amplificação por PCR	O objetivo desta etapa é amplificar o DNA tagmentado e purificado através de um programa de PCR em um termociclador. A reação de PCR irá inserir indexadores e adaptadores comuns, necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras, que serão transferidas para um termociclador e submetidas ao seguinte programa: incubações por 72°C por três minutos e 98°C por 30 segundos, seguidos de 10 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e incubação final a 72°C por cinco minutos.
Purificação do produto de PCR	São utilizadas novamente as esferas magnéticas de kits. As esferas irão purificar a biblioteca de DNA, além de remover fragmentos muito pequenos da população total de moléculas.
Primeira Hibridação	Este processo permite que as regiões que queremos capturar e enriquecer (exoma) se liguem às sondas de captura. Para realizá-la, são utilizados 500ng de cada biblioteca quantificada e são formados “pools”. Até 12 bibliotecas podem fazer parte do pool com um único indexador.

Continuação	
Primeira Lavagem	Nesta fase são utilizadas esferas magnéticas com estreptavidina para capturar as sondas contendo as regiões enriquecidas de interesse. Três etapas de purificação irão remover os ligantes inespecíficos das esferas. A biblioteca enriquecida é então eluída das esferas e preparada para uma segunda hibridação.
Segunda Hibridação	Nesta etapa ocorre a captura da biblioteca de DNA eluída pelas sondas específicas para as regiões de interesse (exoma). A segunda hibridação assegura que as regiões correspondentes aos exons sejam enriquecidas. A reação será transferida para um termociclador e submetida ao programa: incubação a 95°C por 10 minutos, seguido de 18 ciclos de 93°C por um minuto (com decréscimo de 2°C por ciclo) e 58°C “overnight”.
Segunda Lavagem	Esta etapa também utiliza esferas magnéticas com estreptavidina para capturar sondas contendo as regiões enriquecidas de interesse (exoma). Três etapas de purificação irão remover os ligantes inespecíficos das esferas. Todas as etapas são idênticas às descritas na etapa de Primeira Lavagem.
Amplificação por PCR	O objetivo desta etapa é utilizar a PCR para amplificar a biblioteca enriquecida de DNA. A biblioteca amplificada será utilizada nas reações de sequenciamento.
Validação da Biblioteca Enriquecida	O objetivo desta etapa é realizar o controle de qualidade e a quantificação da biblioteca de DNA. Para que dados de alta qualidade sejam obtidos nas plataformas de sequenciamento Illumina é necessário que se atinja uma densidade ideal de clusters em cada linha da flowcell. Isto requer uma quantificação precisa das bibliotecas de DNA. A próxima etapa é o experimento de qPCR que será realizado com o kits comerciais e primers específicos. As bibliotecas quantificadas serão diluídas a uma concentração padrão para a etapa de clusterização.
Clusterização e Sequenciamento de Nova Geração	Durante a clusterização um volume de 10ul de DNA molde (2nM) é combinado com 10ul de NaOH 0.1N e incubado durante cinco minutos, esta etapa desnatura as fitas. Em seguida 20ul de DNA desnaturado é transferido para um tubo contendo tampão de hibridação (HT1). O DNA desnaturado é então diluído com HT1 para um volume final de 1000ul em cinco concentrações diferentes. São transferidas partes da amostra DNA + HT1 e da biblioteca controle para oito tubos. As amostras são submetidas à clusterização e após a etapa de clusterização as amostras são sequenciadas em um sequenciador de nova geração. As amostras são multiplexadas para que possam ser submetidas ao sequenciamento na mesma “lane”. O sequenciamento geralmente é realizado em 2x100pb, com cobertura mínima de 100 x (mais de 95% dos SNPs são identificados com esta taxa de cobertura).

**RELAÇÃO DE ARTIGOS SELECIONADOS APÓS EXCLUSÃO DOS
TRABALHOS REDUNDANTES**

Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. Redin C, et al.
Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. Srivastava S, et al.
Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family-based whole-exome sequencing. Helsmoortel C, Vandeweyer G, Ordoukhanian P, Van Nieuwerburgh F, Van der Aa N, Kooy RF.
Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations. Hoischen A, Krumm N, Eichler EE.
 Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. Rauch A, et al
Detection of clinically relevant copy number variants with whole-exome sequencing. De Ligt J, et al.
Sequencing inches closer to the clinic: neonatal, intellectual disorders identified. Kuehn BM.
Whole-exome sequencing for finding de novo mutations in sporadic mental retardation. Robinson PN.
Advances in genetic diagnosis of neurological disorders. Toft M.
Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. Willemsen MH, Kleefstra T.
Exome sequencing in unspecific intellectual disability and rare disorders. Rauch A.
Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. Moeschler JB, Shevell M, Saul RA, Chen E, Freedenberg DL, Hamid R, Jones MC, Stoler JM, Tarini BA.
Whole-exome sequencing emerges as clinical diagnostic tool: Testing method proves useful for diagnosing wide range of genetic disorders. Levenson D.
Exome sequencing in the diagnostics of developmental delay/intellectual disability. Willemsen MH, Kleefstra T, Yntema HG.
Efficient application of next-generation sequencing for the diagnosis of rare genetic syndromes. Madrigal I, Alvarez-Mora MI, Karlberg O, Rodríguez-Revenga L, Elurbe DM, Rabionet R, Mur A, Pie J, Ballesta F, Sauer S, Syvänen A-C, Milà M.

<p>Next generation sequencing in nonsyndromic intellectual disability: From a negative molecular karyotype to a possible causative mutation detection. Athanasakis E, Licastro D, Faletra F, Fabretto A, Dipresa S, Vozzi D, Morgan A, D'Adamo AP, Pecile V, Biarnés X, Gasparini P.</p>
<p>Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. Soden SE, Saunders CJ, Willig LK, Farrow EG, Smith LD, Petrikin JE, LePichon J-B, Miller NA, Thiffault I, Dinwiddie DL, Twist G, Noll A, Heese BA, Zellmer L, Atherton AM, Abdelmoity AT, Safina N, Nyp SS, Zuccarelli B, Larson IA, Modrcin A, Herd S, Creed M, Ye Z, Yuan X, Brodsky RA, Kingsmore SF.</p>
<p>Personalized genomic neurology: Future is now. Córdoba M, González Morón D, Rodríguez-Quiroga SA, Kauffman MA.</p>
<p>Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, Van De Vorst M, Van Bon BWM, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A, Leach R, Klein R, Tearle R, Bo T, Pfundt R, Yntema HG, De Vries BBA, Kleefstra T, Brunner HG, Vissers LELM, Veltman JA.</p>
<p>De Novo Mutations in Moderate or Severe Intellectual Disability. Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi J-M, Daoud H, Nassif C, Patry L, Massicotte C, Ambalavanan A, Spiegelman D, Diallo O, Henrion E, Dionne-Laporte A, Fougerat A, Pshezhetsky AV, Venkateswaran S, Rouleau GA, Michaud JL.</p>
<p>Next-generation sequencing may reduce cost and wait time for some genetic diagnoses: Experts argue that clinical evaluation remains crucial. Levenson D.</p>
<p>Exome sequencing; Lessons from 500 diagnostic exomes. Brunner HG.</p>
<p>Diagnostic exome sequencing in intellectual disability. Veltman JA.</p>
<p>Massively parallel sequencing for diagnosing clinically and genetically heterogeneous disorders. Zhang VW.</p>
<p>Clinical utility of exome sequencing. Neveling K, Gilissen C, Vissers L, De Ligt J, Ijntema H, Feenstra I, Brunner H, Veltman J, Scheffer H, Nelen M.</p>
<p>Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. De Ligt J, Willemsen MH, Van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-Van Silfhout AT, Koolen DA, De Vries P, Gilissen C, Del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, De Vries BBA, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LELM.</p>
<p>Non-familial cases of intellectual disability could be linked to de novo genetic mutations: studies suggest the potential of exome sequencing to diagnose causes of severe cases. Levenson D.</p>
<p>Updates in the Genetic Evaluation of the Child with Global Developmental Delay or Intellectual Disability. Flore LA, Milunsky JM.</p>

De novo diagnostics of patients with intellectual disability. Veltman JA.
De novo mutations in human genetic disease. Veltman JA, Brunner HG.
Exome sequencing: A transient technology for molecular diagnostics? Ku C-S, Cooper DN.
Exome and whole-genome sequencing for gene discovery: The future is now! Majewski J, Rosenblatt DS.
Genomics, intellectual disability, and autism. Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP.
Human genome sequencing in health and disease. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA.
Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: Lessons for diagnostic workflow and research. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JAS, Ophoff RA.
De novo mutations in mental retardation. Veltman JA.
Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman J.A.
Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. Topper S, Ober C, Das S.
Clinical genetics in the era of next generation sequencing. Brunner HG.
Great expectations: Using massively parallel sequencing to solve inherited disorders. Corbett M, Gecz J.

Obs: Os artigos selecionados para compor o corpo da evidência estão marcados com realce.