

APLICAÇÕES DO SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO NA SAÚDE

Dulceria Costa da Silva (1), Bruno Luiz Fonseca Chamber-Reis (2).

1 – Universidade Estadual da Paraíba (UEPB); 2 – Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG).
Email: bruno.schamber@fcm.edu.br

Resumo: A informação genética contida no DNA coordena os processos que ocorrem no organismo. Conhecer esta sequência pode informar, conseqüentemente, quais destes processos apresentam falhas, resultando nos fenótipos vistos em doenças. A forma mais moderna de sequenciamento é o de “nova geração”, constituído por uma série de técnicas que permitem o sequenciamento paralelo massivo do DNA. O presente trabalho busca abordar um panorama geral de como esta técnica pode ser utilizada em favor da saúde humana. O sequenciamento de nova geração produz enorme quantidade de dados que podem ser utilizados em várias áreas da saúde. Quando se trata de doenças, estes dados podem auxiliar no seu diagnóstico, prognóstico, além de desenvolvimento e otimização de terapias. Dentre as utilidades práticas desta tecnologia cabe citar o diagnóstico de doenças genéticas nas quais os testes tradicionais por algum motivo não foram eficientes, o diagnóstico molecular e classificação dos diversos subtipos de determinadas patogêneses heterogêneas, o diagnóstico pré-natal de aneuploidias, em estudos epigenéticos e na medicina personalizada. Finalmente, considera-se que o sequenciamento de nova geração é um método inovador que fará parte do futuro das ciências biomédicas, aprimorando a compreensão e tratamento de doenças.

Palavras-chave: Sequenciamento, NGS, biologia molecular, doença genética, genoma.

INTRODUÇÃO

A função de armazenamento da informação genética do DNA foi comprovada pelos experimentos de Avery-McLeod-McCarty e colaboradores em 1944, enquanto a sua estrutura foi primariamente elucidada por Watson e Crick em 1953 (DAHM, 2005). Desde então, há um grande alocamento de esforços para compreender a dinâmica de processos e fenômenos que envolvem o DNA.

O sequenciamento de DNA provê dados que podem ser utilizados nos mais diversos âmbitos da ciência, incluindo estudos evolutivos e filogenéticos e na busca da base genética de patogêneses, o que implica uma

melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de determinadas doenças. Os dados oriundos do sequenciamento também são essencialmente empregados na clonagem gênica e na reprodução (LIU, 2012).

O método primordial de sequenciamento, criado em 1977, porém amplamente utilizado até os dias de hoje é o chamado “método de Sanger” – em alusão ao seu desenvolvedor. É conhecido como sequenciamento de “primeira geração” e se baseia no sequenciamento por terminação de cadeia. No sequenciamento de Sanger, são incorporados, estocasticamente, didesoxinucleotídeos acoplados a

fluorocromos. Enquanto a incorporação dos didesoxinucleotídeos impede que a polimerização continue, gerando fragmentos de tamanhos distintos, a fluorescência específica de cada fluorocromo é captada por um laser, que identifica a identidade do nucleotídeo terminal (SHENDURE & JI, 2008). O primeiro passo para a utilização das tecnologias atuais voltadas para a saúde humana foi o sequenciamento completo do genoma pelo Projeto Genoma Humano – realizado com muito esforço entre as décadas de 1990 a início dos anos 2000 – que permitiu uma aceleração no entendimento da etiologia e fisiopatologia de uma parte representativa das doenças genéticas. Este progresso permitiu uma melhor compreensão de como falhas ou anormalidades moleculares ocasionam distúrbios que afetam o organismo (COLLINS, 1999). Todavia, nas últimas duas décadas, as tecnologias de sequenciamento, bem como as suas aplicações, têm evoluído e se difundido rapidamente, de modo que se tornam cada vez mais rápidas, acuradas e com custo relativamente menor.

Atualmente, a forma mais moderna de se realizar análises moleculares se dá por meio do chamado sequenciamento de nova geração ou NGS (do inglês *Next Generation Sequencing*). Existem diversas plataformas que se baseiam na premissa de sequenciamento paralelo massivo, ou seja,

consiste na geração de centenas de milhões de fragmentos curtos de DNA, que possuem entre 30 a 400 nucleotídeos. Estes fragmentos são, então, alinhados com uma sequência do genoma humano, tornando possível desde a visualização de mutações pontuais à anormalidades genéticas amplas, como modificação no número de cópias gênicas ou cromossômicas, bem como visualização de segmentos de DNA inativos por ligação à proteínas (GOYA, 2010; SHENDURE & JI, 2008; SOTO, 2016).

A importância do sequenciamento de nova geração torna-se evidente em casos que necessitam de medicina especializada, na qual o diagnóstico, tratamento e terapias dependem de análises moleculares individuais, como é visto em muitos (se não todos) os tipos de câncer. Por outro lado, a utilização difundida desta tecnologia ainda é um desafio devido ao fato de atualmente seu custo ser considerado alto. (HUSNESS, 2011). O presente trabalho busca construir um panorama geral das diversas utilidades de tecnologia de NGS nas diversas áreas da saúde humana.

METODOLOGIA

O trabalho consistiu em uma revisão bibliográfica, tendo como ênfase conceitos e aplicações do sequenciamento de nova geração na saúde humana. Foram utilizados dados científicos resgatados das plataformas

SciELO e *PubMed* considerando-se de maior relevância os artigos publicados ao longo dos últimos dez anos, visto que tal período compreende o desenvolvimento, evolução e consolidação destes métodos. Contudo, alguns trabalhos publicados em períodos anteriores também foram considerados a fim de construir um panorama geral das utilidades desta tecnologia em benefício da saúde humana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A saber, as plataformas de sequenciamento de nova geração mais utilizadas comercialmente são providas pela Roche (Roche 454 sequencing), Illumina (Illumina HiSeq e Illumina MySeq) e Life Technologies (SOLiD e Ion Torrent). Embora cada plataforma utilize mecanismos químicos diferentes para geração e reconhecimento da sequência de DNA, todas elas fazem uso de fragmentação do DNA genômico e posterior ligação a sequências específicas conhecidas, utilizadas como adaptadores (MELDRUM, 2011).

O sequenciamento de nova geração é considerado o método mais eficaz para análise de mutações e provê dados detalhados sobre doenças genéticas, epigenéticas ou mesmo doenças causadas por microrganismos. Por conseguinte, o método de NGS pode ser útil na prevenção e diagnóstico precoce de

doenças e transtornos, além de tornar possível a caracterização molecular de subtipos de doenças e monitoramento de tais patologias, contribuindo ainda para esclarecer sobre a influência genética na efetividade do uso determinados tipos de terapias (CHRYSTOJA & DIAMANDIS, 2014). Além disso, quando se trata especificamente de doenças infecciosas, conhecer o genoma dos agentes causadores é crucial para entendimento da evolução e co-evolução destas espécies, dos mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia da infecção e dos mecanismos bioquímicos e celulares de resistência à drogas. Outro diferencial deste método em comparação às análises tradicionais consiste em ser a única metodologia capaz de detectar mutações em portadores de doenças genéticas esporádicas, nas quais não se possui um gene candidato (LOHMANN & KLEIN, 2014). Isso é possível já que a abordagem por NGS permite obter a grande maioria da sequência do genoma completo de um organismo (incluindo também algumas trechos contendo repetições) em um curto período de tempo e com grande acurácia (LIU, 2012).

De acordo com o conselho de diretores do American College of Medical Genetics and Genomics (2012), a realização do NGS é indicada quando o paciente apresentar um fenótipo ou histórico familiar que sejam

indicativos de etiologia genética, mas que não seja compatível com uma doença na qual fatores genéticos e sua relação com a clínica seja conhecida. Também é aplicado às doenças genéticas heterogêneas e outras nas quais as análises convencionais não permitem chegar a um diagnóstico.

Existem três finalidades principais para a utilização do NGS: sequenciamento completo do genoma, sequenciamento do exoma (apenas os éxons e as regiões de junção éxon-íntron) e a construção de painéis multigênicos (REIS-FILHO, 2009). O sequenciamento completo do genoma ou WGS (do inglês, *Whole Genomic Sequencing*) consiste no sequenciamento completo do genoma do organismo. Tal método provê, consequentemente, um mapa detalhado de mutações pontuais (em regiões codificantes ou não), inserções e deleções, além de informações minuciosas sobre alterações estruturais ou numéricas. Sendo assim, é uma metodologia inovadora para explicar eventos clínicos com base em características moleculares (MELDRUM, 2011).

O sequenciamento de partes de regiões codificantes (éxons) do DNA realizado pelo método de Sanger depende da seleção de genes candidatos, seja pelo conhecimento prévio da relação de tais genes com outras doenças, pelo conhecimento da função proteica dos genes em estudo ou por estudos

de *linkage* que indicaram determinada região cromossômica (BOTSTEIN & RISCH 2003). Com o advento do NGS, milhões de variantes podem ser identificadas ao longo do genoma de uma única vez. Quando se sequencia apenas as partes codificantes é possível identificar mutações que ocasionam a modificação da função de proteínas, levando a um determinado fenótipo clínico. Neste método, denominado sequenciamento completo do exoma ou WES (do inglês *Whole Exome Sequencing*) é possível ainda filtrar as variantes de maior interesse, como mutações em estado de homozigose, mutações não-sinônimas ou variações em sítios de splicing. Desta forma, é possível reduzir o número de genes elencados como possíveis causadores da doença em questão em até 95% (GLISSEN, 2012).

Os painéis multigênicos ou “*panel testing*” são uma opção para observar variantes que podem ser associadas a fatores de risco para algumas doenças. Tal abordagem busca montar perfis de genótipos que estão relacionados a determinadas patologias. Assim, esta ferramenta é de grande relevância na área de genética médica, viabilizando o diagnóstico precoce de patologias com base no seu perfil molecular, o que permite um melhor aconselhamento genético de casais portadores de alelos mutantes (KINGSMORE, 2012).

Sequenciamento de nova geração e o diagnóstico de doenças

Mutações são responsáveis por uma grande parte das doenças humanas. Desta forma, identificar os genes responsáveis pelo desenvolvimento de uma doença é o primeiro passo para entender sua fisiopatologia e elaboração de futura intervenção terapêutica (GLISSEN, 2012). Neste sentido, o NGS busca realizar uma análise conjunta de múltiplos genes com menor gasto e maior agilidade, tanto na verificação da influência familiar nas doenças como no estudo de genes de importância clínica e terapêutica (MELDRUM, 2011).

A tecnologia de NGS é considerada como revolucionária para o diagnóstico de doenças que possuem base genética, facilitando também o entendimento dos mecanismos envolvidos em tais afecções, além de ser o método mais eficaz para detecção e determinação de doenças de diagnóstico difícil, como por exemplo, subtipos de câncer e doenças heterogêneas (CHRYSTOJA, 2014).

A utilidade do WES para estabelecer o diagnóstico molecular em um grupo heterogêneo de pacientes portadores de microcefalia e deficiência intelectual foi avaliada e, como resultado, em cerca de 30% dos casos foi possível um diagnóstico

conclusivo, de acordo com mutações encontradas determinados genes. Portanto, a técnica de WES é uma poderosa ferramenta para a avaliação do diagnóstico de transtornos do neurodesenvolvimento altamente heterogêneos (RUMP, 2016).

Já ao submeter pacientes acometidos por uma doença heterogênea resultante de falhas na fosforilação oxidativa – patologia esta cuja base molecular não é facilmente estabelecida devido à sua multigenicidade, heterogeneidade alélica e aos efeitos pleiotrópicos - concluiu que a utilização do NGS para diagnóstico desta classe de doenças é promissor. Além disso, o autor ressalta que, com o diagnóstico molecular, torna-se possível a subclassificação de doenças com base na severidade das falhas bioquímicas e, com isso, direcionar possíveis intervenções terapêuticas a fim de assegurar mais qualidade de vida aos indivíduos (CALVO, 2012).

A rapidez no diagnóstico de doenças genéticas por NGS pode ser exemplificada quando se demonstra ser possível – após o recebimento das amostras biológicas – realizar as análises moleculares e chegar ao diagnóstico em um período de vinte e seis horas (MILLER, 2015).

Sequenciamento de nova geração e diagnóstico pré-natal de aneuploidias

NGS pode detectar aneuploidias, tais como aneuploidias relacionadas com os cromossomos X ou Y e trissomias dos cromossomos 21, 13 e 18, que resultam em síndromes que causam um grande impacto na saúde ou, em casos extremos, ocasionam a morte do indivíduo (LIM, 2013).

O diagnóstico pré-natal das trissomias normalmente é realizado apenas em situações específicas. Testes para trissomia do 21 (que leva à Síndrome de Down), por exemplo, é realizado convencionalmente apenas em gestações consideradas como de risco para tal anormalidade, como é o caso de gestantes de idade avançada, onde o risco de aberrações cromossômicas é maior. As análises são feitas a partir do material biológico colhido por amniocentese ou por amostragem das vilosidades coriônicas (CHIU, 2011). Todavia, é sabido que há uma pequena quantidade de DNA fetal livre circulando no plasma materno, o qual pode ser utilizado por métodos não-invasivos como o NGS que, além de ser não-invasivo, apresenta ainda a capacidade de transpor a limitação imposta pela pequena quantidade de DNA fetal circulante. O sequenciamento deste DNA permite identificar sua origem cromossômica específica. Como fetos portadores de trissomias tem maior quantidade de DNA circulante no plasma materno proveniente do cromossomo adicional, a análise da proporção

destes segmentos permite concluir se o feto é normal ou portador de alguma anomalia cromossômica (PALOMAKI, 2011, 2012).

Sequenciamento de nova geração e estudos epigenéticos

Segundo Wu (2001), epigenética é o estudo das mudanças na função dos genes sem que tenham ocorrido mudanças na estrutura do DNA. Isto se dá porque a interação entre DNA e proteínas desempenha papel essencial na regulação e controle dos processos moleculares (HURD & NELSON, 2009).

O NGS pode detectar pontos onde o DNA se encontra inativo devido à metilação, além de mapear pontos de ligação dos fatores de transcrição e esclarecer sobre mecanismos de regulação epigenética, fenômenos que não são esclarecidos pelas análises a nível genético. Estes dados além de informar sobre diagnóstico, orientam o prognóstico de algumas doenças – tais como câncer – desempenhando papel essencial nos âmbitos clínico e terapêutico (HURD & NELSON, 2009; MELDRUM, 2011; SOTO, 2016).

NGS de microrganismos causadores de doenças

Conhecer a sequência de DNA de microrganismos é um grande interesse da clínica humana pois representa impactos no

diagnóstico e entendimento das patogêneses, desenvolvimento de tecnologias preventivas além de prover diretrizes sobre a evolução dos micróbios. Neste sentido, o NGS é um método que pode ser utilizado rotineiramente e em tempo real com objetivos profiláticos, terapêuticos e epidemiológicos no âmbito da vigilância das doenças infecciosas (RADFORD, 2012). Kuno & Chang (2007) e Radford (2012) relatam que além de prover informações sobre a biodiversidade de vírus, o NGS pode auxiliar no entendimento de relações filogenéticas entre os vírus e, conseqüentemente, no entendimento de como os eventos de recombinação culminam na emergência de pandemias. Adicionalmente, Kwok & Chiang (2016) relatam que o método tradicional de sequenciamento demanda uma grande quantidade de material genético viral, o que pode inviabilizar as análises em ampla escala. O NGS, no entanto, é capaz de gerar um grande número de dados enquanto os microrganismos têm seu genoma sequenciado como produto secundário do sequenciamento do DNA do hospedeiro, com base no mapeamento das seqüências que não estão no DNA do hospedeiro, as quais são utilizadas como referência para determinar que o fragmento gerado é proveniente do microrganismo.

Sequenciamento de nova geração e neoplasias

O NGS tem sido extensamente utilizado para o diagnóstico de câncer, seja em casos onde o diagnóstico convencional tenha falhado ou para elaborar um diagnóstico molecular de subtipos, visto que as neoplasias podem ser classificadas de acordo com sua complexidade genômica que determinam grande parte do prognóstico clínico (KOLMAN, 2010). Ley e colaboradores (2008) utilizaram a tecnologia de NGS para realizar análises em células tumorais de um paciente acometido de leucemia mieloide aguda, mas que havia recebido um exame citogenético que o diagnosticou como normal. Foram encontradas uma série de mutações associadas ao desenvolvimento e progressão da neoplasia. Shyr & Liu (2013) relatam que o NGS é um método promissor no que se trata de identificar mutações relacionadas à oncogênese, evolução e metástase; caracterizar os subtipos dos cânceres de acordo com a base molecular e identificar heterogeneidade genética inter e intratumoral. Outro benefício quando se refere especificamente ao câncer é a possibilidade de identificação de mutações secundárias que levam à resistência às terapias comumente utilizadas (REIS-FILHO, 2009).

Além da utilização mais tradicional, uma abordagem que vem sendo extensamente

adotada é a construção de painéis multigênicos para determinar combinações de genes que são associados com determinados tipos de câncer. Tal abordagem tem como uma de suas finalidades a prevenção, com base no conhecimento individual de genótipos de risco (DALUCA, 2014). Outras estratégias que visam reunir e interpretar dados sobre genética e biologia molecular de diversos tipos de câncer através de uma perspectiva mais integrada, foi iniciado um esforço colaborativo que resultou na criação do *The Cancer Genome Atlas* (<http://cancergenome.nih.gov/>). Esta estratégia tem como objetivo gerar, unir, analisar e interpretar perfis genômicos, epigenômicos, transcriptômicos e proteômicos relativos à casos de câncer de diversas partes do mundo (WEINSTEIN, 2013).

Sequenciamento de nova geração e medicina personalizada

No caso do tratamento de doenças humanas de causa molecular, é possível o desenvolvimento de testes moleculares ou genéticos que melhor predigam respostas às terapias. Surge assim a farmacogenômica e a farmacogenética, que tentam entender como os fatores genéticos influenciam na resposta a medicamentos. Assim, torna-se possível desenvolver novas terapias, bem como

otimizar a utilização das já existentes (HAMBURG & COLLINS, 2010; WHIRL-CARRILLO, 2012). Além disso, a abordagem por NGS pode revolucionar a medicina personalizada, visto que esta volta-se à relação risco-benefício e custo-efetividade das intervenções de saúde no que se trata da compreensão molecular individual de doenças, seu prognóstico e probabilidade de resposta ao tratamento (DEVERKA & DREYFUS, 2014).

Embora promissora, a abordagem medicina-farmacologia ainda encontra uma série de obstáculos, dentre os quais podemos citar a dificuldade na identificação de marcadores genéticos efetivos para cada droga, limitações nos efeitos colaterais dos medicamentos e na condução clínica de estudos que correlacionem as variantes gênicas e as respostas às drogas (HAMBURG & COLLINS, 2010). Para vencer tais desafios têm sido desenvolvidas plataformas que compilam, analisam e comparam conhecimento científico gerado por diversos estudos, a fim de auxiliar no entendimento de como variantes genéticas contribuem para respostas às drogas (WHIRL-CARRILLO, 2012).

CONCLUSÃO

As novas formas de sequenciamento, por gerarem um enorme número de dados

com rapidez e compreensão relativamente simples, têm mudado a forma do pensamento científico, seja no entendimento de processos básicos quanto de mecanismos específicos, os quais têm grande potencial de aplicação na saúde. Embora as utilidades práticas do sequenciamento de nova geração atualmente estejam aquém do seu potencial, tal metodologia é considerada um dos componentes essenciais do futuro das ciências médicas, haja visto o grande impacto positivo que causa em todos os âmbitos da saúde.

REFERÊNCIAS

- ACMG Board of Directors. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. **Genet Med.** 2012;14(8):759-761.
- BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nat Genet** 2003;33:228-237.
- CALVO, S. E.; et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with target Next-Generation Sequencing. **Sci Transl Med** 4:118ra10.
- CHIU, R. H. K., et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. **BMJ** 2011;312:c.7401.
- CHRYSTOJA, C. C.; DIAMANDIS, E. P. Whole genomic sequencing as a diagnostic test: challenges and opportunities. **Clinical chemistry** 2014;60(5):724-733.
- COLLINS, F. S. Shattuck lecture - medical and societal consequences of the human genome project. **The New Engl J Med** 1999;341(1):28-37.
- DALUCA, H.; STUENKEL, A. J.; DOLINSKY, J. S. et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. **Genetics in Medicine** 2014;16(11):830-837.
- DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental biology** 2005;278:274-288.
- DEVERKA, P. A.; DREYFUS, J. C. Clinical integration of next-generation sequencing: coverage and reimbursement challenges. **Journal of law, medicine & ethics** 2014;42:22-41.
- GLISSEN, C.; HOISCHEN, A.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A. Disease gene identification strategies for exome sequencing. **European Journal of Human Genetics** 2012;20:490-497.
- GOYA, R.; SUN, M. G. F.; MORIN, R. D.; et al. SNVMix: predicting single nucleotide variants from next-generation sequencing of tumors. **Bioinformatics** 2010;26(6):730-736.
- HAMBURG, M. A.; COLLINS, F. S. The path to personalized medicine. **The New**

England Journal of Medicine

2010;363(4):301-304.

HURD, P. J.; NELSON, C. J. Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. **Brief Funct Genomic Proteomic**. 2009;8:174-183.

KINGSMORE, S. F.; LANTOS, J. D.; DINWIDDIE, D. L.; MILLER, N. A.; SODEN, S. E.; FARROW, E. G.; SAUNDERS, C. J. Next-generation community genetics for low- and middle-income countries. **Genome Medicine** 2012;4(3):25–32. doi:10.1186/gm324.

KOLMAN, A., et al. Next-Generation Sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. **Journal of Clinical Oncology** 2010;28(24):3858-3865.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. J. Full-length sequencing characterization of Bagaza, Kedougou and Zika viruses. **Archives of Virology** 2007;152:687-696.

KWOK, H; CHIANG, A. K. S. From conventional to next generation sequencing of Epstein-Barr virus genomes. **Viruses** 2016;8(60) doi: 10.3390/v8030060.

LEY, T. J.; MARDIS, E. R.; DING, L. et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. **Nature** 2008;456:66-72.

LIM, J. H.; PARK, S. Y., RYU, H. M. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 using free-cell fetal DNA in maternal blood.

Obstet Gynecol Sci 2013;56(2):58-66.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of Next-Generation Sequencing systems. **J. of Biomedicine and Biotechnology** 2012; 251364.

LOHMANN, K.; KLEIN, C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. **Neurotherapeutics** 2014;11:699-707.

MELDRUM, C.; DOYLE, M. A.; TOTHILL, R. W. Next-generation sequencing for cancer diagnosis – a practical perspective. **Clin Biochem Rev** 2011;32:177-195.

MILLER, N. A.; FARROW, E. G.; GIBSON, M. et al. a 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diagnosis. **Genome medicine** 2015;7(100) [doi10.1186/s13073-015-0221-8](https://doi.org/10.1186/s13073-015-0221-8)

PALOMAKI, G. E. et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. **Genet Med** 2011;13(11):913–920.

PALOMAKI, G. E. et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy of 18 and trisomy of 13 as well as down syndrome: an international collaborative

study. **Genetics in Medicine** 2012;14(3):296-305.

RADFORD, A. D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A. C.; HALL, N. Applications of next-generation sequencing technologies in virology. **Journal of General Virology** 2012;93:1853-1868.

REIS-FILHO, J. S. Next-generation sequencing. **Breast Cancer Research** 2009, 11(3):S12.

RUMP, P; JAZAYERI, O.; DIJK-BOS, K. K. et al. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. **BMC Medical Genomics** 2016;9(1):7.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology** 2008;26(10):1135-1145.

SHYR, D.; LIU, Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. **BioMed Central** 2013;15(1):4 doi: 10.1186/1480-9222-15-4.

SOTO, J.; RODRIGUEZ-ANTOLIN, C.; VALLESPÍN, E.; CARPENHO, J. C.; CACERES, I. I. The impact of Next-Generation Sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. **Translational research** 2016;169:1-18 doi:10.1016/j.trsl.2015.11.003.

WEINSTEIN, J. N.; COLLISON, E. A.; MILLS, G. B.; SHAW, K. R. M.;

OZENBERGUER, B. A.; ELLROT, K.; SHMULEVICH, I.; SANDER, C.; STUART, J. M. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis Project. **Nature genetics** 2013;42(10):1113-1120.

WHIRL-CARRILLO, M.;McDONAGH, E. M.; HEBERT, J. M.; GONG, L.; SANGKUH, K.; THORN, C. F.; ALTMAN, R. B.; KLEIN, T. E. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. **Clin Pharmacol Ther.** 2012;92(4):414–417.

WU, C.; MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. **Science** 2001; 293: 1103–1105.