



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**Paneles Génicos como Herramienta
para el Diagnóstico de
Enfermedades Raras en Pediatría**

Sofia Isabel Barbosa Sousa Gouveia

**ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN
MEDICINA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Paneles Génicos como Herramienta para el Diagnóstico de Enfermedades Raras en Pediatría

Dña. Sofia Isabel Barbosa Sousa Gouveia

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 13 de Julio de 2020





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Paneles Génicos como Herramienta para el Diagnóstico de Enfermedades Raras en Pediatría

Dña. María Luz Couce Pico

Dña. María Rosaura Leis Trabazo

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por **Dña. SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 13 de Julio de 2020

Fdo. María Luz Couce Pico

Fdo. María Rosaura Leis Trabazo



El autor declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.







AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras, Maria Luz Couce y Rosaura Leis, por la oportunidad que me dieron de formar parte de su grupo de investigación, un equipo increíblemente unido y muy profesional. Quiero agradecer especialmente a MariLuz, por su energía, incansable apoyo y disponibilidad en cualquier momento durante estos años. Admiro su extrema dedicación a la clínica y a la ciencia. A pesar de las dificultades, *uno tiene que ser noble!*

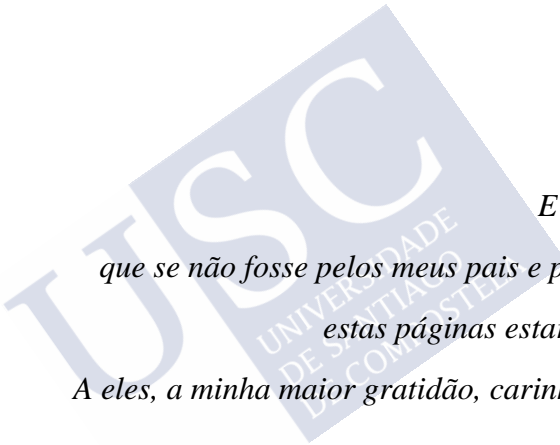
Esta tesis no habría sido la misma si no fuera por la ayuda y apoyo incesante de Emiliano González, y seguramente no voy a conseguir escribir las palabras exactas que consigan demostrar todo el agradecimiento que siento! Admiro su entusiasmo por la ciencia y como transmite sus conocimientos. Con la hipótesis de la *Red Queen*, me ha enredado en la fascinación del mundo de las mitocondrias!

Quiero agradecer con mucho cariño a José Cocho, que me ha acompañado desde el primer día en la unidad, y claro, a todo mi querido y estimado equipo! Victor, Pablo, Daniel, Roi, Maria José, Teresa, Álvaro, Miguel, Daisy, Loló, Cristóbal, Carmen, Avelino, los técnicos de laboratorio.... gracias por alegrarme los días, todos los días, y hacer de esta unidad un equipo tan familiar!

Agradezco a Richard Rodenburg y a Liesbeth Wintjes, y a todo su equipo por su dedicación en enseñarme tanto en solamente 3 meses de estancia en Nijmegen. Guardo en la memoria las reuniones semanales, las discusiones científicas, y alguna palabra en holandés que me intentaron enseñar con esfuerzo. *Dank u!*

Y finalmente, estoy muy agradecida a todos mis amigos que tuvieron la paciencia y el cariño de acompañarme estos años: Xaquín, Mayka, Argi, Marina, Inés, Daniela, Sabela, Raquel, Lourenço, João, Zé, Ana Cristina, Ana Paula, Beta ... Sin ellos, sería todo distinto!



A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA' written in a smaller font below it.

*E tenho a certeza,
que se não fosse pelos meus pais e pela minha irmã,
estas páginas estariam em branco.
A eles, a minha maior gratidão, carinho e admiração!*





RESUMO

Estímase que as enfermidades raras no seu conxunto afectan a entre un 3,5% e un 5,9% da poboación mundial, o que se traduce en preto de 30 millóns de persoas afectadas en Europa, e 300 millóns a nivel mundial. Ata a data identificáronse ao redor de 6000 enfermidades raras, das cales o 70% son pediátricas. O diagnóstico destas patoloxías é un dos desafíos máis complexos aos que se enfrontan os especialistas en pediatría, dado que se caracterizan por unha ampla diversidade de síntomas e signos pouco específicos que varían non só dunha enfermidade a outra, senón tamén dun paciente a outro padecendo a mesma enfermidade. Desafíos que poden ocultar enfermidades subxacentes e que inevitablemente conducen ao atraso no diagnóstico e tratamento destes pacientes.

As tecnoloxías de secuenciación de próxima xeración (NGS), están a cambiar o panorama das probas xenéticas en enfermidades raras e como consecuencia, o paradigma do diagnóstico destas patoloxías. O avance destas tecnoloxías permitiu a análise simultánea de centos / miles de xenes en moi pouco tempo e a baixo custo, ofrecendo varias estratexias para apoiar o diagnóstico destes trastornos. Unha destas estratexias é o deseño de paneis xénicos específicos de enfermidade. Neste proxecto de tese deseñáronse 10 paneis xénicos individuais que inclúen xenes asociados a Erros Conxénitos do Metabolismo (ECM) e a enfermidades neurolóxicas. Posteriormente, todos os xenes incluídos nos paneis individuais foron agrupados nun panel único, o NeuroExoma. En total estudáronse 825 pacientes <18 anos, por sospeita de enfermidade metabólica e/ou neurolóxica, e o estudo xenético realizouse por: análise exclusiva do panel individual, análise exclusiva do NeuroExoma e análise do panel individual complementada por NeuroExoma cando o resultado do primeiro é negativo. As taxas de

diagnóstico entre os diferentes paneis individuais variaron entre o 4,8% (no panel de discapacidade intelectual) e o 58,3% (no panel de defectos do metabolismo intermediario). Con relación ás tres estratexias implementadas, as taxas de diagnóstico globais dos paneis individuais e do NeuroExoma foron similares, ao redor do 24%. A partir da análise dos datos xenéticos obtidos, foi posible describir a arquitectura molecular asociada aos ECM e enfermidades neurolóxicas, onde as variantes de novo, o mosaicismo e as CNVs gañaron relevancia nos últimos anos, así como a detección de variantes patoxénicas recorrentes na nosa poboación e posibles casos de herdanza dixénica. Como parte deste traballo de tese foi levada a cabo unha estancia internacional no Radboud University Medical Center. Durante este período, realizáronse estudos funcionais para confirmar a patoxenicidade de variantes identificadas en pacientes con sospeita de enfermidade mitocondrial. Os resultados obtidos corroboran a sospeita xenética inicial, destacando a importancia destas probas como complementación na interpretación da análise xenética.

En resumo, as tecnoloxías NGS teñen un potencial enorme como test de primeira liña nas probas xenéticas para o diagnóstico de enfermidades raras, aínda que quedan limitacións por solucionar. A implementación clínica destas probas permite non só un asesoramento xenético adecuado para o paciente e familia, senon tamén o desenvolvemento doutras potenciais aplicacións clínicas como o diagnóstico prenatal, ou o cribado xenético neonatal.

Palabras chave: NGS, Paneis Xenéticos, Enfermidades Raras, ECM, Neurolóxica

RESUMEN

Se estima que las enfermedades raras en su conjunto afectan a entre un 3,5% y un 5,9% de la población mundial, lo que se traduce en cerca de 30 millones de personas afectadas en Europa, y 300 millones a nivel mundial. Hasta la fecha se han identificado alrededor de 6000 enfermedades raras, de las cuales el 70% son pediátricas. El diagnóstico de estas patologías es uno de los desafíos más complejos a los que se enfrentan los especialistas en pediatría, dado que se caracterizan por una amplia diversidad de síntomas y signos poco específicos que varían no solo de una enfermedad a otra, sino también de un paciente a otro padeciendo la misma enfermedad. Desafíos que pueden ocultar enfermedades subyacentes y que inevitablemente conducen al retraso en el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes.

Las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), están cambiando el panorama de las pruebas genéticas en enfermedades raras y como consecuencia, el paradigma del diagnóstico de estas patologías. El avance de estas tecnologías ha permitido el análisis simultáneo de cientos / miles de genes en muy poco tiempo y a bajo coste, ofreciendo varias estrategias para apoyar el diagnóstico de estos trastornos. Una de estas estrategias es el diseño de paneles génicos específicos de enfermedad. En este proyecto de tesis se han diseñado 10 paneles génicos individuales que incluyen genes asociados a Errores Congénitos del Metabolismo (ECM) y a enfermedades neurológicas. Posteriormente, todos los genes incluidos en los paneles individuales fueron agrupados en un panel único, el NeuroExoma. En total se han estudiado a 825 pacientes <18 años, por sospecha de enfermedad metabólica y/o neurológica, y el estudio genético se ha realizado por: análisis exclusivo del panel individual, análisis exclusivo del NeuroExoma y análisis del panel individual complementada por NeuroExoma cuando el resultado del primero es negativo. Las tasas de diagnóstico entre los diferentes paneles individuales variaron entre el

4,8% (en el panel de discapacidad intelectual) y 58,3% (en el panel de defectos del metabolismo intermediario). Con relación a las tres estrategias implementadas, las tasas de diagnóstico globales de los paneles individuales y del NeuroExoma fueron similares, alrededor del 24%. A partir del análisis de los datos genéticos obtenidos, fue posible describir la arquitectura molecular asociada a los ECM y enfermedades neurológicas, donde las variantes de novo, el mosaicismo y las CNVs han ganado relevancia en los últimos años, así como la detección de variantes patogénicas recurrentes en nuestra población y posibles casos de herencia digenica. Como parte de este trabajo de tesis fue llevada a cabo una estancia internacional en Radboud University Medical Center. Durante este periodo, se han realizado estudios funcionales para confirmar la patogenicidad de variantes identificadas en pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial. Los resultados obtenidos corroboran la sospecha genética inicial, relevando la importancia de estas pruebas como complementación en la interpretación del análisis genético.

En resumen, las tecnologías NGS tienen un potencial enorme como test de primera línea en las pruebas genéticas para el diagnóstico de enfermedades raras, aunque quedan limitaciones por solucionar. La implementación clínica de estas pruebas permite no sólo un asesoramiento genético adecuado para el paciente y familia, como también el desarrollo de otras potenciales aplicaciones clínicas como el diagnóstico prenatal, o el cribado genético neonatal.

Palabras clave: NGS, Paneles Genéticos, Enfermedades Raras, ECM, Neurológicas

ABSTRACT

It is estimated that rare diseases affect between 3.5% and 5.9% of the world's population, which means about 30 million people are affected in Europe, and 300 million worldwide. So far, about 6,000 rare diseases have been identified, of which 70% are pediatric. The diagnosis of these disorders is one of the most complex challenges faced by pediatric specialists, as they are characterized by a wide variety of unspecific symptoms and clinical signs that vary not only from one disease to another, but also from one patient to another suffering from the same disorder. These challenges can hide underlying diseases and inevitably will lead to delays in the diagnosis and treatment of these patients.

Next-generation sequencing technologies (NGS) are changing the landscape of genetic testing in rare diseases and, as a result, their diagnostic paradigm. The development of these technologies has allowed the simultaneous analysis of hundreds / thousands of genes in a very short time and at low cost, offering several strategies to support their diagnosis. One of these strategies is the design of disease-specific gene panels. In this thesis project, 10 individual gene panels have been designed that include genes associated with Inborn Errors of Metabolism (IEM) and neurological diseases. Subsequently, all genes included in the individual panels were grouped into a single panel, called NeuroExoma. Genetic studies were performed on a total of 825 patients, <18 years of age, with suspicion of metabolic and / or neurological disease, as followed: exclusive analysis of the individual panel, exclusive analysis of NeuroExoma and analysis of the individual panel supplemented by NeuroExoma when the result of the first approach was negative. Diagnosis rates between the different individual panels ranged from 4.8% (in the intellectual disability panel) to 58.3% (in the intermediate metabolism defects panel). Regarding the three implemented strategies, the overall diagnostic rates of the individual

panels and NeuroExoma were similar, around 24%. From the analysis of the genetic data obtained, it was possible to describe the molecular architecture associated with IEM and neurological diseases, where *de novo* variants, mosaicism and CNVs have been highlighted in recent years, as well as the detection of recurrent pathogenic variants in our population and possible cases of digenic inheritance. As part of this thesis work an international stay was conducted at Radboud University Medical Center. During this period, functional studies were performed to confirm the pathogenicity of variants identified in patients with suspected mitochondrial disease. The results obtained corroborate the initial genetic suspicion, highlighting the importance of these tests as a complement to the interpretation of genetic analysis.

In summary, NGS technologies have enormous potential as a first-line genetic testing for the diagnosis of rare diseases, although limitations remain to be addressed. The clinical implementation of these tests allows not only adequate genetic counseling for the patient and family, but also the development of other potential clinical applications such as prenatal diagnosis, or newborn genetic screening.

Keywords: NGS, Genetic Panels, Rare Diseases, IEM, Neurologic

ABREVIATURAS

ACMG	American College of Medical Genetics
AD	Autosómico Dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
APS	Persulfato de amonio
AR	Autosómico Recessivo
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
B	Benigna
BAM	Binary Alignment Map
bp	base pairs
BWA	Burrows-Wheeler Aligners
C	Conflicto de interpretaciones
CNV	Copy Number Variation
ddNTP	Didesoxinucleótidos
DE	Desviación Estándar
DEL	Delección
DISC INT	Discapacidad Intelectual
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DN	<i>de novo</i>
dNTP	Desoxinucleótidos
DUP	Duplicación
ECAR	Tasa de Acidificación Extracelular
ECM	Errores Congénitos del Metabolismo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
EIEE	Encefalopatía Epiléptica Infantil de Inicio Temprano
ENCODE	Enciclopedia de Elementos de ADN
EPI	Epilepsia
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESP	Exome Sequencing Project

ESS	Exonic Splicing Silencer
ETC	Cadena de transporte de electrones
ExAC	Consortio de Agregación de Exomas
FCS	Suero fetal de ternera
FS	Frameshift
GATK	Genoma Analysis Toolkit
GC	Contenido en guanina y citosina
GERP	Genomic Evolutionary Rate Profiling
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosín trifosfato
GTR	Genetic Testing Registry
GWAS	Genome Wide Association Studies
H	Herencia
HE	Hemicigoto
HGMD	Human Gene Mutation Database
HGVS	Human Genome Variation Society
HIPO/HIPER	Hipo/Hiperglucemia
HO	Homocigoto
HNO/A	Hermano/a
HPA	Hiperfenilalalinemia
HPO	Human Phenotype Ontology
HT	Heterozigoto
HT C	Heterocigoto compuesto
ID	Discapacidad Intelectual
LB	Probablemente benigna
LCR	Líquido ceforraquídeo
LGMD	Distrofia Muscular de la Cintura Escapular
lncARN	Ácido ribonucleico no codificante largo
LP	Probablemente Patogénica
LSDB	Locus Specific Databse List
LTBL	Leucoencefalopatía con afectación del tálamo y tronco encefálico con acidosis láctica
MAF	Frecuencia del Alelo Menor
MAT	Materna

MET INT	Metabolismo Intermediario
MISS	Missense
MITO	Mitocondrial
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MOL COMP	Moléculas Complejas
MORF CER	Morfogénesis Cerebral
MOS	Mosaicismo
MOV	Trastornos del Movimiento
MRI	Resonancia Magnética
MUS	Neuromuscular
ncARN	Ácido ribonucleico no codificante
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ND	No disponible
NGS	Next-Generation Sequencing
NHGRI	Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI)
NON	Nonsense
OCR	Tasa de Consumo de Oxígeno
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OXPHOS	Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System
P	Patogénica
PAT	Paterna
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGH	Proyecto del Genoma Humano
piARN	microARN asociado a piwi
PKU	Fenilcetonuria
RTA	Real Time Analysis
SAM	Sequence Alignment Map
siARN	microARN de interferencia corto
SMRT	Single Molecule Real Time
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
SPL	Splicing
STR	Repeticiones en tandem cortas

SV	Variación Estructural
SYN	Sinónima
TMAP	Programa de alineación de mapeo de torrents
UCSC	University of California Santa Cruz Genome Browser
UTR	Región no codificada
VCF	Variant Calling Format
VUS	Variante de significado incierto
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
XL	Herencia ligada al cromosoma X





ÍNDICE

RESUMO	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA HUMANO.....	2
1.1.1. El inicio de la era genómica	2
1.1.2. Evolución en la secuenciación de nueva generación – <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS).....	4
1.1.2.1. Secuenciadores de segunda generación.....	8
1.1.2.2. Secuenciadores de tercera generación.....	13
1.2. EL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO	15
1.3. EL GENOMA HUMANO	17
1.3.1. Principales iniciativas desarrolladas tras el conocimiento del Genoma Humano.....	19
1.3.2. Bases de datos.....	21
1.4. ANÁLISIS DEL GENOMA HUMANO	23
1.4.1. Herramientas de análisis bioinformático	23
1.4.1.1. Análisis primario	25
1.4.1.2. Análisis secundario	27
1.4.1.3. Análisis terciario	30
1.5. APLICACIÓN DE LA NGS EN LA CLÍNICA.....	33
1.5.1. Paneles genéticos	34

1.5.2.	Secuenciación Completa del Exoma (WES) versus Secuenciación Completa del Genoma (WGS)	36
1.6.	ENFERMEDADES GENÉTICAS	39
1.6.1.	Enfermedades Minoritarias.....	41
1.6.1.1.	Errores Congénitos del Metabolismo – ECM	43
1.6.1.2.	Enfermedades Neurológicas.....	50
1.7.	IMPLICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	57
2.	OBJETIVOS.....	60
2.1.	OBJETIVOS PRINCIPALES.....	60
2.1.1	Objetivos secundarios.....	60
2.2.	PRINCIPIOS DEL MÉTODO.....	60
3.	MATERIAL AND METHODS	63
3.1.	STUDY DESIGN	63
3.2.	PATIENTS.....	63
3.3.	GENE PANELS DESIGN	63
3.3.1.	Genetic panels technical features	64
3.4.	NGS SEQUENCING.....	65
3.4.1.	Samples reception and DNA extraction	67
3.4.2.	DNA Libraries with Sequence Capture	68
3.5.	BIOINFORMATIC ANALYSIS	70
3.5.1.	Primary analysis	71
3.5.1.1.	Image analysis and Base Calling.....	71
3.5.1.2.	Quality control.....	72
3.5.2.	Secondary analysis	72
3.5.2.1.	Genome assembly	72
3.5.2.2.	Variant calling	73

3.5.3.	Terciary analysis.....	75
3.5.3.1.	Identification and annotation of the identified variants	75
3.5.3.2.	Variant filtering and prioritization.....	76
3.5.3.3.	Variant report	78
3.6.	CARRIER STUDY – SANGER SEQUENCING	79
3.6.1.	Primer design for amplification.....	79
3.6.2.	Polymerase Chain Reaction - PCR.....	79
3.7.	FUNCTIONAL STUDIES	79
3.7.1.	Cell culture	80
3.7.2.	Mitochondrial isolation	80
3.7.3.	Measurement of mitochondrial respiration and OXPHOS complexes activity.....	80
3.7.4.	SDS-PAGE and BN-PAGE immunoblot analysis.....	81
3.7.5.	Viral transfection and transduction: pLenti6.2 V5	82
3.7.5.1.	Lentivirus transduction in primary fibroblasts for functional complementation	85
4.	RESULTADOS.....	88
4.1.	ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO (ECM)	91
4.1.1.	Panel de Hipoglucemia e Hiperglucemia	91
4.1.2.	Defectos del Metabolismo Intermediario	94
4.1.3.	Enfermedades Mitocondriales	96
4.1.4.	Defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias	100
4.2.	ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS	103
4.2.1.	Epilepsia	104

4.2.2.	Defectos de la Morfogénesis Cerebral.....	110
4.2.3.	Discapacidad Intelectual.....	114
4.2.4.	Enfermedades Neuromusculares	115
4.2.5.	Ataxias y Trastornos del Movimiento	120
4.2.6.	Ciliopatías.....	122
4.2.7.	Patrones de herencia asociados a los ECM y Enfermedades Neurológicas.....	124
4.3.	NEUROEXOMA	126
4.4.	REANÁLISIS POR NEUROEXOMA DE PACIENTES CON RESULTADO GENÉTICO PREVIO NEGATIVO	129
4.4.1.	Pacientes con sospecha clínica inicial de enfermedad mitocondrial	129
4.4.2.	Pacientes con sospecha clínica inicial de Epilepsia....	132
4.4.3.	Pacientes con sospecha clínica inicial de defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias	134
4.4.4.	Pacientes con sospecha clínica inicial de Defectos de la Morfogénesis Cerebral	135
4.4.5.	Pacientes con sospecha clínica inicial de Ataxia y Trastornos del Movimiento	136
4.5.	RESULTADOS GLOBALES.....	136
4.5.1.	Tasas de diagnóstico global por Panel Individual y NeuroExoma.....	136
4.5.2.	Variantes Identificadas	137
4.5.3.	Detección de variantes <i>de novo</i>	139
4.5.4.	Detección de variantes recurrentes	142
4.5.5.	Detección de Copy Number Variation (CNVs).....	142
4.5.6.	Detección de herencia digénica	143

4.5.7. Utilidad diagnóstica: Panel Individual, NeuroExoma, Panel Individual y Reanálisis por NeuroExoma	144
4.6. ESTUDIOS FUNCIONALES	145
4.6.1. FOXRED1: paciente 43.....	145
4.6.1.1. FOXRED1 modelo de proteína.....	145
4.6.1.2. Respiración mitocondrial y actividad OXPHOS.	146
4.6.1.3. Análisis de inmunoblot SDS-PAGE y BN-PAGE	148
4.6.2. EARS2: paciente 163 y paciente 362	149
4.6.2.1. Respiración mitocondrial y actividad OXPHOS.	149
4.6.3. Transfección y transducción viral: pLenti6.2 V5	151
4.7. ISODISOMIA MATERNAL en TTN – PACIENTE GR146	154
5. DISCUSIÓN.....	157
5.1. ARQUITECTURA GENÉTICA DE LOS ERRORES CONGÉNITAS DEL METABOLISMO (ECM)	157
5.2. ARQUITECTURA MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS	164
5.2.1. Herencia dominante y el papel de las variantes <i>de novo</i> en las enfermedades neurológicas	164
5.3. EL PAPEL DE LA CNVs EN LA ENFERMEDAD.....	173
5.4. VARIANTES RECURRENTES	176
5.5. HERENCIA DIGÉNICA	178
5.6. MOSAICISMO	183
5.7. LA IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES EN LA VALIDACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS	186
5.1. TASAS DE DIAGNÓSTICO	191

5.1.1.	Tasa de diagnóstico en los Paneles Genéticos Individuales	191
5.1.1.1.	Errores Congénitos del Metabolismo (ECM).....	191
5.1.1.2.	Enfermedades Neurológicas.....	193
5.1.2.	Tasa de diagnóstico: Paneles, NeuroExoma y Paneles+NeuroExoma	195
5.2.	LIMITACIONES	197
5.2.1.	Demostración de causalidad de una variante.....	197
5.2.2.	Expansión de trinucleótidos	198
5.2.3.	No detección de variantes en regiones codificantes ...	199
5.2.3.1.	Exones ricos en GC	199
5.2.3.2.	Regiones altamente homólogas.....	199
5.2.4.	Limitaciones bioinformáticas	199
5.2.5.	Variantes perdidas en regiones no codificantes.....	200
5.2.6.	Variantes perdidas en el mosaicismo somático	201
5.2.7.	Variantes epigenéticas perdidas.....	202
5.2.8.	Influencia de otros mecanismos desconocidos.....	202
5.3.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	204
5.3.1.	Farmacogenómica.....	204
5.3.2.	Translación del WGS a la clínica	205
5.3.3.	Genética en el cribado neonatal.....	206
6.	CONCLUSIONS	210
7.	ARTÍCULOS PUBLICADOS	213
8.	REFERENCIAS	255
9.	ANEXO	300





1. INTRODUCCIÓN

1.1. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA HUMANO

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material. Watson and Crick, 1953

1.1.1. El inicio de la era genómica

En mayo de 1952, Rosalind Franklin y Raymond Gosling, hallaron una de las primeras evidencias de la estructura del ácido desoxirribonucleíco (ADN) mediante difracción de rayos X, la famosa fotografía 51 (Figura 1a) ¹. El 25 de abril de 1953, John Watson y Francis Crick publicaban un artículo en Nature, donde, basándose en el patrón de densidades electrónicas de la fotografía 51, proponían un modelo para la estructura química de la molécula de ADN (Figura 1b) ². El artículo finalizaba con la frase preliminar de esta introducción, que contiene una de las ideas más importantes de la historia de la ciencia.

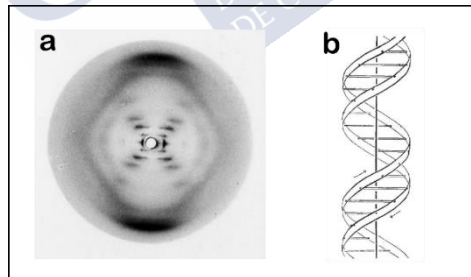


FIGURA 1 - a) FOTO 51. Imagen de difracción de rayos X de la forma B, hidratada, de la molécula de ADN. Tomada por Raymond Gosling y Rosalind Franklin en mayo de 1952 (archivo del Kings College London). b) MODELO DE LA MOLÉCULA DE ADN propuesto por Watson y Crick en su artículo en Nature de abril de 1953.

El modelo propuesto por John Watson y Francis Crick, una doble hélice formada por dos cadenas complementarias antiparalelas, en las

que las bases nitrogenadas se apareaban adenina con timina y citosina con guanina, implicaba un posible mecanismo de replicación, al poder actuar cada cadena como molde de su complementaria ³. La demostración del mecanismo de replicación semiconservativa por Matthew Meselson y Franklin W. Stahl en 1958 ⁴, cambió para siempre la manera de entender la herencia genética. Al mismo tiempo el conocimiento de las propiedades derivadas de la complementariedad del ADN y de su mecanismo de replicación proporcionaron la base para el desarrollo tecnológico de la mayor parte de las técnicas empleadas para el estudio y secuenciación del ADN y, por lo tanto, están en el origen de la genómica, definida de una manera amplia como el estudio de la secuencia, estructura, función y evolución del material genético de un organismo.

Los primeros métodos de secuenciación del ADN, definida como la determinación del orden de las bases nucleotídicas en un fragmento de ADN, no se describieron hasta 1977 de manera independiente por los grupos de Maxam y Gilbert, en la Universidad de Harvard, y el grupo de Sanger, en la Universidad de Cambridge. En Febrero de 1977, Walter Gilbert y Allan Maxam publicaron un método de secuenciación no-enzimático basado en la degradación química específica de las bases nitrogenadas del ADN ⁵. El proceso era complejo y las lecturas de ADN eran cortas, de alrededor de 100pb máximo. Poco después, en diciembre del mismo año, Frederick Sanger describió la metodología de la secuenciación por síntesis del ADN ⁶. El método de Sanger determinaba la secuencia de bases de ADN, utilizando un método enzimático que sustituyó rápidamente al método de Maxam-Gilbert ⁷. El método inicial de Sanger utilizaba didesoxinucleótidos (ddNTP), nucleótidos en los que el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa ha sido sustituido por un hidrógeno. Esta modificación impide la formación del enlace fosfodiéster durante la reacción de síntesis de ADN, terminando la misma cada vez que se incorpora un ddNTP. La secuencia se produce en una serie de 4 reacciones separadas (A, C, G y T), donde se añade una cantidad de ddNTP a las reacciones (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, respectivamente), junto con los respectivos desoxinucleótidos de trifosfato convencionales (dNTP), uno de ellos marcado con ³²P (Mardis, 2013). Por lo tanto, el ddNTP competirá con su respectivo

dNTP en la reacción de polimerización mediada por una ADN polimerasa en presencia de un ADN molde y un oligonucleótido que actúe como cebador. La incorporación del ddNTP producirá un conjunto de cadenas de oligonucleótidos de longitud variable, reflejando la distribución de cada dNTP en la secuencia de ADN. Después de la electroforesis y la autorradiografía posterior, es posible deducir, a partir del tamaño de los fragmentos, la secuencia de bases que forman el fragmento de ADN analizado ⁶.

El siguiente avance se produjo gracias al descubrimiento de la ADN polimerasa termoestable, que condujo al desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ⁹. La incorporación de la amplificación previa a la reacción de secuenciación supuso una mejora notable de la técnica al permitir que se partiera de cantidades significativamente menores de ADN. Los avances en la bioquímica de nucleótidos también fueron importantes, con la introducción de ddNTP marcados con fluorocromos, en lugar de radioisótopos. Como resultado de todos estos avances, surgió el método de secuenciación automática de ADN basado en el método de Sanger, en el que los productos de la reacción de secuenciación son separados mediante electroforesis capilar, y los nucleótidos son identificados por la emisión de fluorescencia específica inducida por la acción de un láser ¹⁰. Estos avances contribuyeron en gran medida al aumento significativo de rendimiento de cada reacción con la automatización, permitiendo que en cada ejecución se cargaran hasta 96 muestras ⁸. El uso de un software específico permite la traducción del electroferograma obtenido en secuencias de ADN, además de generar el cálculo de la probabilidad de error para cada base identificada ¹¹.

1.1.2. Evolución en la secuenciación de nueva generación – *Next-Generation Sequencing* (NGS)

Aunque el método de Sanger, el cual se podría considerar como la “primera generación” de secuenciación de ADN, fue fundamental en el origen de la medicina molecular y muy útil para el diagnóstico de enfermedades raras o complejas, y cuyo diagnóstico genético implicaba

la secuenciación de una cantidad pequeña de ADN, del orden de Kb, pronto se mostró claramente insuficiente, cuando el objetivo implicaba secuenciar algo más que genes individuales. El método había alcanzado su límite y no quedaban opciones que permitiesen optimizarlo y reducir el coste y el tiempo necesario para abordar la secuenciación genómica¹². Fue necesario un desarrollo integrado en varios campos como la bioquímica, ingeniería de hardware y software hasta llevar a la aparición de la segunda generación de tecnología de secuenciación – secuenciación de nueva generación, o *Next-Generation Sequencing* (NGS).

Las nuevas plataformas de secuenciación, que surgieron a partir del 2004, utilizan una estrategia metodológica similar, donde tienen en común la amplificación de los fragmentos de ADN de interés espacialmente separados, pero presentan diferentes enfoques dependiendo de las características de la plataforma y de lo que se pretende estudiar (Mardis, 2017, 2008). Generalmente, en la tecnología NGS, se parte de la construcción de una biblioteca de fragmentos de ADN genómico con un determinado tamaño. Esta fragmentación puede ser llevada a cabo por métodos mecánicos como la sonicación o enzimáticos. Hay diferentes tipos de bibliotecas de fragmentos de ADN, dependiendo si el objetivo del estudio es secuenciación dirigida de regiones específicas: biblioteca de fragmentos de ADN con tamaño variable y adaptadores universales en los extremos (Figura 2a); biblioteca con código de barras, en la cual se añade al fragmento una secuencia de ADN determinada que sería el “código de barras” (Figura 2b); o si es para secuenciación de regiones complejas y repetitivas, y la más adecuada sería una biblioteca *mate-pair*, donde dos fragmentos de ADN separados por un adaptador interno están también rodeados por adaptadores universales (Figura 2c).

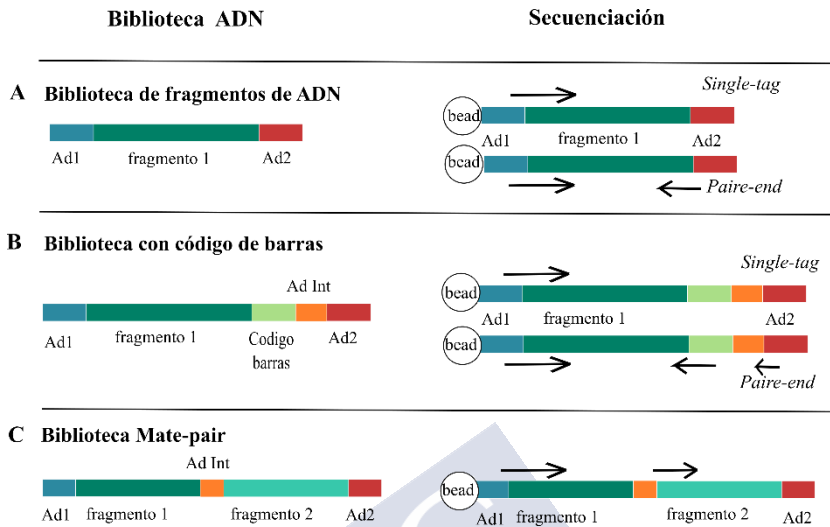


FIGURA 2 - Ejemplos de bibliotecas de ADN usadas en NGS a) biblioteca de fragmentos de ADN de tamaño variable (150 - 1000bp) con adaptadores universales b) biblioteca de código de barras, una secuencia específica de indexación de la muestra c) biblioteca *mate-pair* donde dos fragmentos de ADN están unidos por un adaptador interno. *Ad1* - *adaptador universal 1*; *Ad2* - *adaptador universal 2*; *Ad Int* - *Adaptador Interno*

Después de finalizadas las librerías estas son preparadas para la secuenciación mediante amplificación clonal. Este proceso genera varias copias de cada uno de los fragmentos de DNA que constituyen la librería manteniéndolos separados lo que por un lado amplifica la señal que se genera permitiendo la detección de los nucleótidos durante la secuenciación y permite que esta señal se produzca de manera inequívoca.

En el caso de la secuenciación dirigida las reacciones de secuenciación se realizan a partir de los fragmentos amplificados y para que esto suceda, se agrega un adaptador a cada extremo de los fragmentos presentes en la biblioteca mediante la acción de una ADN ligasa. Estos adaptadores son secuencias de bases universales y específicas de la plataforma, lo que permite amplificar los fragmentos de la biblioteca por PCR, así como su posterior unión a la celda donde se produce la reacción de secuenciación, mediante el uso de secuencias complementarias fijadas a dichas celdas y que constituyen la *flowcell*

¹⁴. De hecho, para minimizar los sesgos generados por esta técnica y mantener la uniformidad de la cobertura, la PCR se realiza con el menor número de ciclos posible ¹⁵. Otra variante sería la adición de colas poli-A a un extremo de los fragmentos, aunque esto se usa principalmente en tecnologías de secuenciación de moléculas individuales ¹⁶. Como resultado de la amplificación se obtienen grupos, *clusters*, de fragmentos, y cada grupo se origina a partir de un solo fragmento en la biblioteca. Esto proporcionará suficiente señal de cada fragmento en la reacción de secuenciación. Debido a este proceso de amplificación combinada con la secuenciación posterior, estas plataformas utilizan una metodología de secuenciación masiva en paralelo. Esto es uno de los avances clave de estas tecnologías, ya que estas plataformas permiten secuenciar, simultáneamente, cientos de miles a millones de fragmentos de ADN, durante una única carrera, lo que se traduce en una potencia enorme de secuenciación y en la generación de un gran número de datos. Esta maximización del rendimiento por carrera se traduce en costes de secuenciación considerablemente más bajos que los asociados a la secuenciación tipo Sanger ¹⁷. Otra de las grandes ventajas de estas tecnologías es la posibilidad de realizar un enriquecimiento dirigido mediante el uso de sondas específicas, mediante el cual podemos seleccionar aquellas regiones de interés a estudiar, permitiendo la aplicación de la NGS en la secuenciación de determinados genes que podrían estar implicados en enfermedades humanas y, contribuyendo al desarrollo de técnicas de diagnóstico como el diseño de paneles génicos específicos para patologías ¹⁸.

El análisis de los datos generados mediante tecnología NGS presenta una dificultad asociada al tamaño de ADN de las secuencias obtenidas. A diferencia de lo que sucede en la secuenciación tipo Sanger, en la que la limitación del tamaño del fragmento viene dada por la capacidad de resolución del capilar en el que se realiza la electroforesis, y el resultado es la suma de miles de secuencias idénticas, en NGS el tamaño se determina en función de la relación señal-ruido y, en general se obtienen millones de fragmentos diferentes de pocos cientos de bases ¹⁹. La dificultad estriba en el alineamiento de estas secuencias frente al genoma de referencia, sobre todo en regiones con un alto contenido repetitivo y ricas en los nucleótidos GC. Esto,

llevó al desarrollo de algoritmos bioinformáticos específicos para el ensamblaje de este tipo de lecturas ^{20,21}. Surgen así dos aproximaciones diferentes para la secuenciación: secuenciación de un solo extremo (*single-end sequencing*) y secuenciación de extremo emparejado (*paired-end sequencing*). Mientras que en la secuenciación de extremo único los fragmentos se secuencian partiendo únicamente de uno de los extremos, en la secuenciación de extremo emparejado los fragmentos se secuencian partiendo de ambos extremos. Esta última proporciona datos de mayor calidad, facilita el alineamiento de las secuencias y permite la detección de variantes tipo delección/inserción que no es posible detectar mediante la secuenciación de extremo único ¹⁷.

1.1.2.1. Secuenciadores de segunda generación

A pesar de las similitudes descritas anteriormente, las plataformas de segunda generación son bastante diversas con relación a la longitud de lectura y la química empleada en la secuenciación.

La pirosecuenciación (454 Life Sciences / Roche) fue inicialmente desarrollada en 1996 por el Instituto de Tecnología Stockolm Royal y fue la primera tecnología NGS disponible en 2005 ²². Esta técnica se basa principalmente en la hibridación de oligonucleótidos y detección y cuantificación de la actividad de la enzima ADN polimerasa, a través de la enzima luciferasa. El paso inicial de esta tecnología era la generación de una biblioteca de fragmentos de ADN, que posteriormente se sometían a amplificación mediante PCR de emulsión en la superficie de cientos de miles de *beads* de agarosa. La formación de micelas acuosas permite generar micro reactores, donde cada *bead* se incorpora individualmente, junto con los reactivos de PCR. La amplificación de un solo fragmento de la biblioteca genómica unida a cada *bead*, permite formar al menos 1,000.000 de copias de ese fragmento por *bead*, lo que permitía obtener una señal detectable en la reacción de secuenciación ²³. Después de romper las micelas, cada *bead* se incorpora en un pocillo de 44µm de una placa junto con los reactivos de secuenciación. Las bases se agregan secuencialmente, reacción catalizada por la ADN polimerasa, y cada vez que se agrega un

nucleótido, se libera pirofosfato. Este pirofosfato reacciona con el persulfato de amonio (APS), reacción mediada por la ATP sulfurilasa, y da lugar a adenosina trifosfato (ATP) y sulfato. El ATP reacciona con la luciferina y O_2 , en una reacción catalizada por la enzima luciferasa, que conduce a la emisión de luz. La luz producida se detecta en imagen, traduciéndose la misma en la secuencia de bases de nucleótidos ²².

En 2006, surge una metodología que utiliza terminadores reversibles marcados con fluorocromos (Illumina, Solexa Technologies) ¹². Esta aproximación usa la amplificación en puente, *bridge-PCR*, de los fragmentos de ADN de la biblioteca genómica, que han sido previamente inmovilizados en la superficie sólida de la celda de reacción mediante adaptadores. Posteriormente, se realiza la secuenciación por síntesis que permite obtener hasta mil copias idénticas de cada fragmento de ADN de la biblioteca, formando *clusters*, hasta alcanzar una densidad de 10×10^6 cluster/cm² ^{24,25}. En este proceso, las bases son añadidas simultáneamente en la reacción y compiten por la unión de su complementaria del fragmento de DNA del *cluster*. En cada ciclo de la reacción es agregado un único dNTP marcado que actúa como terminador reversible, permitiendo la incorporación y detección de una base única. Para obtención de la imagen de la señal emitida por nucleótidos incorporados, cada una de la *flowcell* es dividida en millares de paneles y cada uno de esos paneles representa una imagen. Después de la lectura de la señal emitida en la imagen, el extremo 3' es químicamente desbloqueado para que el proceso empiece otra vez con la incorporación de los siguientes nucleótidos ²⁶.

En 2008 apareció en el mercado una plataforma que utilizaba secuenciación por ligación (SOLiD4, Applied Biosystem). En esta estrategia, después de la preparación de la librería es usada una PCR por emulsión para amplificar los fragmentos de ADN en la superficie de microrreactores, comúnmente llamados de *beads*, contenidos en una emulsión de aceite y agua. Estos microrreactores son enriquecidos y anclados en una superficie de cristal donde se va a procesar la secuenciación por ligación. Inicialmente un primer universal se une a uno de los adaptadores integrados en el fragmento molde de ADN en la

preparación de la librería. Son añadidas sondas de dos bases que están marcadas con fluorescencia y que van a competir por la ligación al primer usado para secuenciar. Estas sondas presentan estructuras específicas: de ligación, sitio de escisión y 4 tipos fluorescentes diferentes unidos en la última base. La especificidad del proceso es obtenida identificando la primera y segunda base en la reacción de ligación. Estos ciclos de ligación, detección y fragmentación se repiten y la señal fluorescente se detecta durante la fase de ligación y eliminación de las tres últimas bases de la sonda. Las señales son posteriormente convertidas en codificación de colores correspondiente a la secuencia de bases diana ²⁷.

Una nueva metodología surge en 2010, la secuenciación por semiconducción basada en la detección de iones de hidrógeno generados después de la unión del nucleótido al fragmento de ADN (Ion Torrent / Proton, Life Technologies) ²⁸. La amplificación clonal de la biblioteca de fragmentos genómicos se amplifica por PCR de emulsión ²³. Inicialmente millones de fragmentos de ADN preparados se unen a los *bead*. Cada uno de ellos entra en los micropocillos de un microchip laminado (semiconductor) añadiendo en seguida una solución de uno de los nucleótidos. De cada vez que un nucleótido se incorpora al fragmento de ADN, se libera un protón, el cual es detectado por la base del pocillo, la cual actúa como un mini-pHmetro (sensor de iones para detectar variaciones de pH). Una vez que cada lámina del microchip es semiconductor, estos cambios iónicos pueden ser identificados ²⁹. Esta metodología implica la necesidad de que los nucleótidos se incorporen en un orden sistemático, ya que estos no tienen ningún tipo de marcaje que permita su identificación ²⁸. Una de las ventajas sobre esta tecnología es el bajo coste asociado a su rápida secuenciación una vez que no se usan nucleótidos incorporados como en las técnicas anteriores y la señal no es óptica. Sin embargo, la señal eléctrica emitida en gran intensidad debido a la repetición de varias bases en el fragmento de ADN, generando un cambio de pH mayor, no se detecta con mucha precisión ²⁸.

Las plataformas NGS son definidas y evaluadas según: longitud de lectura, rendimiento, precisión, tiempo de obtención de resultados y coste asociado (Tabla 1).



Plataforma / Empresa	Método secuenciación	Método amplificación	Longitud lectura (bp)	Rendimiento	Ratio Error (%)	Tiempo	Coste por Mb
454/ Roche*	Pirosecuenciación	PCR por emulsión	SE o PE: 400; 1000	35 - 700 Mb	3 - 4	10 - 23h	~ 10€
SOLiD4/ Applied Biosystems*	Ligación	PCR por emulsión	SE: 50; 75	~ 30 Gb	0.1 - 1.0	6d - 10d	-0.13€
Ion Torrent/ Life Technologies	Síntesis	PCR por emulsión	SE: 200; 400	600 - 2.000 Mb	~1	2.5h - 7h	-0.05€
Illumina	Síntesis	Fase-sólida PCR	SE o PE: 50; 75; 150 PE: 25; 100; 125; 250; 300	540Mb - 500Gb	0.1 - 1.0	4h - 11d	~ 0.02 - 1€

TABLA 1 - COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS PLATAFORMAS NGS. h - horas; d - días; bp - *base pair*; SE - *single-end*; PE - *paired-end*; * - *descatalogado*. ^{12,17,30}

1.1.2.2. Secuenciadores de tercera generación

El desarrollo de las plataformas de secuenciación de segunda generación fue decisivo en el avance de la tecnología de secuenciación de ADN. De igual manera que las limitaciones de la tecnología Sanger impulsó el desarrollo de la segunda generación de secuenciación, las limitaciones de ésta han impulsado el desarrollo de tecnologías más potentes. Una de las limitaciones está asociada a la amplificación previa de las librerías, que puede introducir potenciales errores por la acción de la polimerasa durante la construcción de la biblioteca genómica, apareciendo variantes que no estaban presentes en la secuencia original. Además, se puede producir la amplificación preferencial de ciertos fragmentos de la biblioteca, llevando a un sesgo en términos de abundancia en los fragmentos finales⁸. Con el objetivo de solventar estas limitaciones mediante la secuenciación directa de la molécula de ADN se desarrolló la tercera generación de plataformas de secuenciación. Estas tecnologías usan secuenciación por síntesis, pero la técnica de detección es diferente, en el reconocimiento físico de las bases de un fragmento de ADN y no en la detección de la incorporación química de los nucleótidos. El desarrollo y aparición de sensores con una sensibilidad muy alta permitió desarrollar sistemas a escala molecular, eliminando la fase de amplificación inicial y, en consecuencia, los errores asociados. Este sistema a escala nanoscópica también tiene la ventaja de una mayor velocidad y bajo coste³¹. Este tipo de tecnología además permite obtener lecturas muy largas, evitando los problemas asociados al alineamiento de secuencias cortas.

Varias plataformas de tecnologías de tercera generación han sido desarrolladas en los últimos años. Una de estas plataformas utiliza la tecnología de nanoporos para secuenciar una sola molécula de ADN (Oxford Nanopore Technologies). En esta aproximación, la secuenciación de la molécula de ADN se realiza a través de nanoporos, similares a una proteína de membrana. Las fluctuaciones en la conductancia inducidas por el paso de la molécula de ADN a

través del poro, o la detección de interacciones de cada base con el poro, son métodos utilizados para obtener la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN, basándose la detección en la señal eléctrica u óptica ³².

Otra plataforma desarrollada por Pacific Biosciences, introdujo un sistema de secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN por la monitorización de la actividad de la ADN polimerasa, por secuenciación SMRT (*Single Molecule Real Time*) ³³. Durante la reacción de secuenciación, un fragmento de la molécula de ADN es alargado por la acción de la ADN polimerasa incorporando dNTPs que están marcados con diferentes fluorocromos en las bases nitrogenadas, en la fracción terminal del fosfato. Esta ADN polimerasa unida al fragmento de ADN se fija covalentemente a la base de una guía de onda de “modo cero” (ZMW) presentes en la matriz donde se produce la reacción. La secuencia de ADN se determina mediante la detección de la fluorescencia asociada a la interrupción de la polimerización inmediatamente después de la formación de un enlace fosfodiéster, es decir, cuando el nucleótido se une al fragmento liberando un fluoróforo, señal en seguida detectada y recogida en un sensor.

Si bien revelan una enorme evolución metodológica, existen algunos desafíos para este tipo de tecnologías, que se centran en mejorar la relación señal / ruido. En este sentido, la investigación continúa desarrollando sensores más precisos con un nivel extraordinariamente bajo de señal producida, así como mecanismos que permiten leer una sola molécula varias veces, para producir un consenso de lectura con una precisión extremadamente alta ¹².

1.2. EL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO

Los objetivos principales del Proyecto del Genoma Humano (PGH), determinar la secuencia del ADN, e identificar y mapear los genes del genoma humano, fueron descritos por primera vez en 1988 por un comité especial de la Academia Nacional de Ciencias de EEUU y fueron coordinados y planificados en etapas de 5 años por los Institutos Nacionales de Salud y el Departamento de Energía ³⁴.

Enfrentándose a un enorme desafío, el PGH empleó un enfoque de dos fases para abordar la secuencia del genoma humano. En la primera fase, fue usada la metodología *shotgun* ³⁵. Esta técnica consiste en la fragmentación aleatoria del ADN genómico seguido de la clonación de los fragmentos generados en vectores antes de la secuenciación, lo que se traduce en una mejora en el tiempo de respuesta a expensas de simplificar el procesamiento computacional. En la segunda fase del proyecto, llamada fase de finalización se centró en cubrir los huecos no resueltos en la fase inicial y en resolver la secuencia de ADN en áreas ambiguas, como regiones repetitivas, que no se obtuvieron durante la fase de *shotgun* por limitación de la metodología ^{36,37}. El aumento exponencial de la información de la secuencia de ADN llevó a que la misma fuese almacenada en la unidad de Secuencias Genómicas de Alto Rendimiento (*High-Throughput Genomic Sequences – HTGS*) de GenBank al final de la fase de *shotgun* ³⁸. En 2001, se publicó el primer borrador del genoma humano, cubriendo aproximadamente el 90% del genoma ³⁶. En 2003, se concluyó el PGH publicándose la secuencia completa del ADN humano al año siguiente ³⁷. Esta secuencia final cubría aproximadamente el 99% de las regiones que contienen genes del genoma humano, con una precisión del 99,99%. Como resultado, el mapeado de la localización cromosómica de los genes ha permitido tener acceso a información detallada sobre la estructura, organización y función del conjunto completo de genes humanos, información considerada como las instrucciones básicas heredables para el desarrollo y la función de un ser humano.

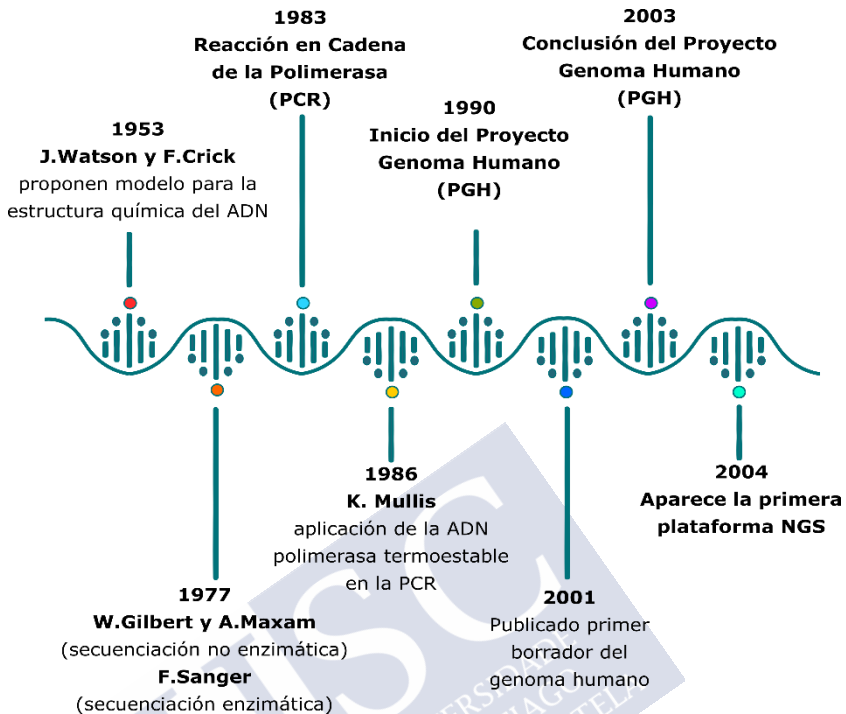


FIGURA 3 - PRINCIPALES HITOS EN LA HISTORIA DEL ESTUDIO DEL GENOMA HUMANO.

Podemos considerarlo un viaje que empezó en 1953 y que culminó en 2003 con la publicación del genoma humano (Figura 3). Inicialmente, la estimación del número de genes humanos oscilaba entre 40.000 y 100.000³⁹. El análisis de la información generada por el PGH permitió realizar una estimación más realista, situando el número de genes codificantes de proteínas entre los 19.000 y los 24.000^{37,40}. Sin embargo, el incremento en el conocimiento sobre el papel de los genes que expresan ARN no codificantes (ncARN), implicados en la regulación de la expresión génica, incluyendo los ARN no codificantes largos (lncRNA) y cortos, entre los que se incluyen los microARNs, los ARN de interferencia cortos (siRNAs) y los ARN asociados a piwi (piRNAs) ha incrementado este número de manera significativa, no habiéndose alcanzado aún un número oficial definitivo (Tina Hesman Saey, 2018; Alles *et al.*, 2019). La última versión (v. 33) de GENCODE (base de datos del Instituto

Europeo de Bioinformática), contabiliza un total de 60.662 genes, de los cuales 19.957 son codificantes de proteínas y 25.528 de ARN no codificante (“GENCODE - Human Release Statistics,” v.33).

El PGH fue sin duda un punto de inflexión en el campo de la genética humana y abrió la puerta a la era genómica. Los resultados finales proporcionaron información sobre la biología básica y evolución de la variación genética humana. Además, tanto la información generada, con el aumento de nuestro conocimiento de la estructura y regulación del genoma humano, así como el impulso al desarrollo tecnológico que acompañó al proyecto, supuso una revolución en el campo de la genética clínica, al dotarnos de unas herramientas que nos han permitido avanzar en la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad humana.

1.3. EL GENOMA HUMANO

El desarrollo de las tecnologías NGS y la conclusión del PGH han revolucionado el conocimiento sobre la genómica humana. El genoma humano consta de aproximadamente 3.000 millones de pb de ADN, distribuido en 46 cromosomas nucleares (44 autosomas y 2 sexuales) y 1 cromosoma mitocondrial, considerablemente más pequeño (16 569 pb). La variación genética, que existe a lo largo de todo el genoma, denota una enorme importancia funcional y, como tal, ha sido el objetivo del análisis del genoma en varios niveles. Se estima que dos individuos elegidos al azar comparten el 99.9% de su genoma. Aproximadamente el 0.1% de la variabilidad en el genoma humano representa ≈ 3 millones de cambios por individuo ⁴⁴. De hecho, ya en 1902 se estableció el concepto de "individualidad química" ⁴⁵, sin embargo, solo con la disponibilidad de la secuencia humana completa, fue posible la caracterización de los diferentes tipos de variantes genéticas.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), variantes de una única base y los INDEL, pequeñas inserciones / deleciones (<50bp) en la secuencia de ADN, representan la forma más abundante de variación en el genoma, habiéndose descrito entre ~3-

4 millones de SNP y ~0,4-0,5 millones de INDEL en el genoma humano en relación a la secuencia de referencia ⁴⁶. Un subtipo de INDEL, que se caracterizan por presentar un número variable de repeticiones en tándem, son las repeticiones en tándem cortas (STR). Esta forma de variación consiste en una pequeña secuencia de longitud variable que se repite varias veces también de manera variable (microsatélites y minisatélites). A pesar de que la mayoría de los SNP no tienen impacto funcional a nivel molecular, algunos pueden afectar a la estructura de las proteínas, como es el caso de las variantes sin sentido (nonsense), o de terminación, las variantes de cambio de sentido (missense) y las variantes que afectan al splicing. que las variantes sin sentido implican la introducción de un codón de terminación prematuro en la secuencia de ADN y potencialmente su impacto sería deletéreo. Se estima que cada genoma porta >100 variantes de terminación en genes codificantes, de las cuales >20 son raras en la población humana ⁴⁷. Las variantes de cambio de sentido o los indels que producen cambios en la secuencia pueden generar modificaciones en los aminoácidos afectando la expresión del gen y por consiguiente la correcta transcripción de la proteína.

Los cambios estructurales (SV – *Structural Variation*) incluyen CNV (*Copy Number Variation* - duplicaciones y deleciones de más de 50bp), inversiones y translocaciones. Están asociados a cambios importantes en la secuencia genética debido a su tamaño, y generalmente representan un desequilibrio en la diploidía en un locus dado, estando asociados frecuentemente a enfermedades raras graves ⁴⁸. Los SV extremadamente grandes que delecionan o duplican determinadas regiones cromosómicas suelen tener un pronóstico grave, estando asociados a muertes prematuras y por lo tanto no se suele observar a menudo en la población ⁴⁶. Sin embargo, estudios recientes en *Whole Genome Sequencing* (WGS) estiman que los individuos de una población pueden ser portadores en media de 2,9 SV raros que podrían alterar las regiones codificadoras del genoma. El 54.5% de estos SVs corresponden a deleciones y el 42.2 a duplicaciones. Además, se estima que el 23.4% afectan a alrededor de 4,2 genes de media ⁴⁹.

En los estudios de la enfermedad mendeliana, así como en el diagnóstico genético de las mismas, es necesaria la priorización de variantes mediante la predicción del impacto y su patogenicidad. En estudios de asociación de variantes raras de enfermedades comunes u otros rasgos complejos, las frecuencias de las variantes alélicas y las predicciones de impacto son usadas para priorizar las causales del defecto molecular y agruparlas por gen que se analizarán para determinar la asociación de fenotipos. Este enfoque ha sido crucial para estudiar enfermedades comunes que están frecuentemente asociadas a variantes raras y de novo, como la epilepsia.

1.3.1. Principales iniciativas desarrolladas tras el conocimiento del Genoma Humano

Desde el inicio de la era genómica y, sobre todo, a partir del desarrollo de la secuenciación de nueva generación, se hizo patente que el conocimiento sobre la variación genética, tanto en la población general, como aquella asociada a enfermedad era de vital importancia a la hora de ser capaces de interpretar la información derivada de la secuenciación del ADN. Por ello, se han desarrollado diversas iniciativas para caracterizar dicha variación, tanto en la población sana como en la población enferma⁵⁰⁻⁵².

Una de las primeras iniciativas fue el proyecto HapMap (*Haplotype Map*), planteado como un proyecto internacional con el objetivo de comprender la relación entre el genoma y la salud en la población creando un mapa de haplotipos del genoma humano y describiendo los patrones comunes de la variación genética humana⁵³. Desarrollado entre los años 2003 y 2006, se ha caracterizado diferentes poblaciones con ascendencia africana, asiática y europea, en relación con variantes comunes, su frecuencia y sus patrones de expresión, es decir, la caracterización de los haplotipos del genoma humano. El impacto de HapMap ha sido enorme y decisivo en la investigación en varios campos, desde el estudio de enfermedades complejas, hasta la genética de poblaciones y la genética evolutiva⁵². A raíz de los datos generados por el proyecto, la realización de

los estudios de asociación de genoma completo (GWAS – *Genome Wide Association Studies*) sufrió un gran impulso. Los GWAS buscan establecer una relación estadística entre una o más variantes de una región genómica dada, con la presencia o ausencia de una condición clínica determinada⁵⁴. A pesar del valor de estos estudios, estos no son capaces de explicar por completo la heredabilidad asociada a estas condiciones clínicas, ya que las variantes comunes (frecuencia del alelo menor - MAF > 5%) que se asocian con un rasgo particular, solo contribuyen a una pequeña fracción de la herencia (< 10%). Por lo tanto, se hizo patente la necesidad de catalogar variantes de baja frecuencia o raras, que son la causa más frecuente de enfermedad genética (MAF < 5%)⁵⁵.

En 2007, se puso en marcha el proyecto internacional 1000 Genomas⁵⁶. Su objetivo era encontrar variantes genéticas con una frecuencia de al menos 1% en la población estudiada (MAF > 1%), secuenciando ≈ 2.500 individuos de más de 20 grupos étnicos. Dentro del alcance de los 1000 genomas, en 2012 se publicó el resultado de la secuenciación de todo el genoma con baja cobertura (2 - 6x) y la secuenciación de todo el exoma (50 - 100x) de 1.092 individuos de 14 poblaciones diferentes en el continente europeo y asiático, africanos y americanos. Desarrollado entre los años 2008 y 2015 el proyecto describió más de 40 millones de variantes genéticas, de las cuales 38 millones son SNP (54% de ellas son nuevos SNP), 1.4 millones de INDEL y 14.000 CNV / SV⁵⁰.

Aunque el estudio de las variantes descritas anteriormente es de gran importancia en la caracterización funcional de la secuencia de ADN, hay otro conjunto de elementos decisivos para la evaluación en términos funcionales. Esta funcionalidad está determinada por el proceso de splicing para la transcripción del ARN, transporte hacia el compartimiento celular apropiado y traducido a proteínas; todos estos procesos son regulados a varios niveles que incluyen la metilación de las islas CpG del ADN, modificación de la cromatina, la unión de factores de transcripción al ADN y unión de factores de splicing al ARN⁵⁷. Conscientes de esta complejidad más allá de la propia secuencia de ADN, en 2003 se fundó un consorcio

internacional llamado Enciclopedia de Elementos de ADN (ENCODE), fundado por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma (NHGRI-NIH) ⁵⁸. ENCODE tiene como objetivo descubrir elementos funcionales no codificantes en el genoma humano, utilizando información de la cromatina; cambios en histonas; posicionamiento de los nucleosomas; metilación del ADN; transcripción e información sobre sitios de unión de factores específicos, con el fin de catalogar identificar elementos reguladores en el ADN ⁵⁹.

1.3.2. Bases de datos

Las bases de datos poblacionales incluyen datos de miles de individuos de varias poblaciones y representan una fuente de información sobre los patrones globales de variación genética humana. Ayuda no solo a identificar los alelos asociados a una enfermedad, sino también a comprender los orígenes de las poblaciones, las migraciones, las relaciones, las mezclas y los cambios en el tamaño de la población, lo que podría ser útil para comprender algunos patrones de enfermedades ⁶⁰.

La base de datos *Single Nucleotide Polymorphism* (dbSNP) es de acceso público y almacena una colección de polimorfismos genéticos que incluyen SNPs, INDEL e inserciones de elementos retroposibles y variaciones de repetición de microsatélites. dbSNP fue desarrollado en 1999 en colaboración con el Centro Nacional de Información (NCBI) y el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI), para complementar la base de datos de GenBank (que almacena secuencias de nucleótidos de más de 100.000 organismos). Los registros anotados incluyen muestras de población para identificar variantes y para medir la frecuencia alélica específica de una población ya que estas pueden variar. Un alelo muy común en una población puede ser bastante raro en otra. Además, las variantes alélicas pueden surgir como polimorfismos individuales cuando poblaciones particulares han sido aisladas

reproductivamente de grupos vecinos, como es el caso de las poblaciones en islas ⁶¹.

El Consorcio de Agregación de Exomas (ExAC), ha generado una de las bases de datos públicas más completas hasta la actualidad que reúne variantes en las regiones codificadoras de proteínas humanas de cerca de 60.706 individuos. Cada variante, su anotación funcional y su frecuencia en las poblaciones globales (africanos, estadounidenses, europeos no finlandeses, europeos finlandeses, asiáticos orientales, asiáticos del sur) están disponibles para la para su uso tanto en el campo de la genética clínica, facilitando la clasificación de variantes de interés en pacientes, como en investigación, para explorar la variación en genes específicos ⁶². De hecho, diferentes estudios han demostrado la utilidad de esta base de datos en el filtrado e identificación de variantes causales de enfermedades raras ^{63,64}. Este recurso proporciona una resolución mucho mayor para filtrar variantes en cohortes clínicas y poblacionales, y limita aún más la capacidad para identificar variantes de codificación funcional relevantes para la enfermedad.

Después del éxito del ExAC, el mismo equipo de investigación dirigido por Daniel MacArthur de Broad Institute, ha desarrollado una base de datos que contiene la información sobre 126.216 exomas y 15.136 secuencias de genoma completo, llamado de GnomAD ("GnomAD Resource Introduced at ASHG Meeting, Doubles ExAC Dataset," 2016). Como complemento al proyecto de 1000Genomas descrito anteriormente, en la actualidad la iniciativa más desarrollada para la identificación y filtración de variantes en una población es el proyecto GnomAD que en su tercera fase, reúne la secuencia del genoma completo de 71702 individuos. ⁶⁶.

La base de datos ESP (*Exome Sequencing Project*) se centra en comprender la contribución de la variación genética rara a los trastornos cardíacos, pulmonares y hematológicos a través de la secuenciación de poblaciones bien fenotipadas y actualmente contiene datos de secuencia de exomas en 6503 individuos, y las frecuencias alélicas son relativas a poblaciones afroamericanas y europeoamericanas. Como ESP es un proyecto de secuenciación del

exoma, la base de datos no es útil para evaluar la frecuencia de la mayoría de las variantes identificadas. Las variantes ESP se mapean contra el genoma de referencia (GRCh37) y junto con la nomenclatura propuesta de la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS) se proporciona números de referencia correspondientes. Una diferencia importante es la inclusión en esta base de datos muestras de individuos con enfermedades raras donde por ejemplo, 418 individuos con fibrosis quística constituyen el 6% en ESP, o se estima la frecuencia de la población de esta enfermedad en individuos de ascendencia del norte de Europa que sería 125 veces más frecuente ⁶⁷.

Los millones de variantes identificadas requieren un filtrado adicional para limitar aquellas que son altamente penetrantes. Este es un proceso lento que requiere el uso de múltiples bases de datos adicionales y búsqueda de literatura para evaluar variantes individuales. Las bases de datos disponibles, además de las bases de datos centradas en la variación descritas anteriormente, incluyen bases de datos depuradas basadas en información más específica de la variante, como es el caso del HGMD (*Human Gene Mutation Database*), bases de datos específicas de locus, LSDB (*Locus Specific Database List*), bases de datos desarrolladas por profesionales centradas en información clínica con algunos datos de variantes como es el caso de GeneReviews, bases de datos seleccionadas que proporcionan información sobre fenotipos heredados y genes con información de variantes seleccionadas como en el OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) y bases de datos de con descripción detallada de variantes identificadas y estudiadas en varios laboratorios, ClinVar (National Center for Biotechnology Information).

1.4. ANÁLISIS DEL GENOMA HUMANO

1.4.1. Herramientas de análisis bioinformático

Como ha sido discutido anteriormente la evolución tecnológica de la secuenciación del genoma por NGS permitió una reducción en el coste de secuenciación mayor de lo que se esperaría de acuerdo con la ley de Moore (inicialmente aplicada a la evolución del hardware computacional y expandida a tecnologías como la secuenciación) (“DNA Sequencing Costs,” 2019). Esto ha permitido que cada vez sea más económico obtener grandes cantidades de datos genómicos de una persona. El alto rendimiento de las tecnologías NGS proporciona un volumen considerable de datos, que necesitan de un posterior procesado bioinformático que permitan su interpretación. De hecho, en la actualidad el verdadero reto se sitúa cada vez más en la capacidad de gestión y análisis de dichos datos, convirtiendo a la bioinformática en un área de vital importancia en la secuenciación genómica ⁴⁶. La bioinformática es, por lo tanto, la disciplina que nos permite comprender los datos producidos por la secuenciación ⁶⁹.

El análisis de una secuencia genómica comienza con la creación de un *pipeline* analítico, a fin de combinar métodos de análisis para obtener resultados biológicamente relevantes. Varias herramientas bioinformáticas están disponibles para realizar cada uno de los pasos del análisis, por lo que es necesario establecer a priori el tipo de datos del genoma que se obtendrán, para una correcta elección de las herramientas que se utilizarán. Una vez que se establece un *pipeline*, presenta un orden predefinido de pasos de análisis y algoritmos internos. El conjunto de pasos que constituyen un *pipeline* comienza con asegurar la calidad de las lecturas obtenidas en la secuenciación y el ensamblaje de la secuencia obtenido a través del alineamiento de las lecturas frente a un genoma de referencia. Posteriormente se realizará el proceso de identificación y anotación de variantes, que nos permite identificar aquellas posiciones en las que nuestra secuencia varía con respecto a la de referencia, así como su consecuencia biológica. Finalmente, dichas variantes se filtrarán y priorizarán ⁷⁰.

1.4.1.1. Análisis primario

El análisis de datos primarios consiste en la detección y análisis de los datos obtenidos de las plataformas de secuenciación sin procesar (análisis de señal), identificando la secuencia de lecturas (llamadas de base) y la valoración de la calidad de la base leída. En el caso de la plataforma de Illumina, los archivos generados se denominan FASTQ.

1.4.1.1.1. Análisis de imagen y asignación de bases

El programa RTA (*Real Time Analysis*) realiza los primeros pasos de análisis de la secuenciación. En el caso de la plataforma Illumina, en cada ciclo de secuenciación el secuenciador produce una foto para cada una de las áreas que conforman la *flow cell*, y en cada una de estas áreas se sacan fotos con los 4 filtros específicos del fluoróforo de cada nucleótido. A partir de estos archivos, y a través del RTA, que permite transformar las señales de intensidad en secuencia de ADN, se localizan los clusters generados y extrae sus intensidades, sus coordenadas y una estimación del ruido para cada cluster. El resultado del análisis de imagen es el dato de entrada para la asignación de las bases. Dependiendo de la eficiencia del proceso, un pequeño número de moléculas pueden adelantarse o retrasarse a su ciclo de incorporación, hechos conocidos como *prephasing* y *phasing*. Este efecto se puede mitigar durante el paso de asignación de bases mediante la aplicación de correcciones. El resultado final es un archivo FASTQ que contiene la secuencia de cada uno de los fragmentos secuenciados. Inicialmente, la secuencia de nucleótidos se presenta en un archivo con formato FASTA, que consiste en un archivo de texto que contiene la secuencia de nucleótidos y es la manera más universal para representar secuencias biológicas. Es en este formato como se presenta el genoma de referencia, contra el que se alinean las secuencias problema. Con el aumento de la capacidad de los secuenciadores, los datos generados, en forma de archivos FASTA y de archivos de calidad de lectura, se hicieron muy pesados, y para reducir el tamaño de los archivos generados se creó el formato

FASTAQ. En este formato, las bases y los valores de calidad se presentan en el mismo archivo ⁷¹.

1.4.1.1.2. Control de Calidad

Algunas de las lecturas obtenidas directamente del secuenciador tienen una calidad relativamente baja y, por lo tanto, las que no cumplen con los estándares de calidad definidos están sujetas a eliminación, corte o corrección. Los errores de lectura de las bases, las lecturas de baja calidad o la contaminación con adaptadores son errores comunes en el producto de la secuenciación, presentando cada tecnología de secuenciación diferente distribución y tipo de errores, dependiendo de su bioquímica de síntesis ⁷². Actualmente, los secuenciadores no solo producen la información de la secuencia de bases, sino que también producen una estimación de la probabilidad de error para cada base identificada. Así, los archivos FASTQ son importantes para el primer paso de control de calidad, ya que contiene todas las lecturas de secuenciación sin procesar y la calidad de esta es crítica para el éxito general del análisis NGS. Para evaluación de la calidad se desarrollaron varias herramientas para evaluación de la calidad de los datos como NGS QC ⁷³, QC-Chain ⁷⁴ y FastQC (“Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data,” accedido en 2020), siendo este último uno de los más usados.

La calidad de los datos de secuenciación se mide utilizando la medida Phred (*Phred Quality Score*), empleada rutinariamente en la metodología de secuenciación Sanger, e indica la fiabilidad de la base asignada en el proceso de secuenciación. Se define en relación con la probabilidad de error en la llamada de una base específica (Pe): $Q_{Phred} = -10\log_{10}(Pe)$. El valor obtenido permite inferir no solo la probabilidad de error sino la precisión de lectura de cada base (Tabla 2) ¹¹.

Valoración Calidad (Q)	Pe	Precisión de lectura de la base
Q10	1 en 10	90%
Q20	1 en 100	99%
Q30	1 en 1.000	99.9%
Q40	1 en 10.000	99.99%

TABLA 2 - VALORES DE CALIDAD PHRED. El nivel de calidad *Phred* (Q) se define en relación con la probabilidad de error de (*Pe*) de lectura para cada base concreta.

Se consideran valores óptimos cuando se observa una media de calidad $>Q20$ (valor que se corresponde con una tasa de error del 1%). Si las lecturas tienen suficiente calidad, las secuencias están listas para alinearse / mapearse contra el genoma de referencia.

1.4.1.2. Análisis secundario

El análisis secundario incluye el alineamiento de las lecturas contra el genoma humano de referencia (frecuentemente se usa la versión *hg19/hg38*) y la llamada de variantes. Hay dos enfoques diferentes para mapear las lecturas de secuenciación: alineamiento de lectura de secuencia, que es la alineación de los fragmentos secuenciados contra un genoma de referencia, o ensamblaje de novo. La elección entre un enfoque u otro se basa en lo que se pretende estudiar siendo en genética clínica, el alineamiento contra una secuencia de referenciala primera opción. Por otro lado, el ensamblaje de novo se suele aplicar a análisis más complejos como la identificación de SV y otros reordenamientos complejos^{76,77}.

1.4.1.2.1. Ensamblaje del genoma

Después del procesamiento de las lecturas según un determinado patrón estándar de calidad, éstas se alinean contra un genoma de referencia. Con el fin de mejorar el ensamblaje del genoma de referencia humano, corrigiendo errores y agregando secuencias para garantizar que proporcione la mejor representación del genoma humano, se estableció el Consorcio de Referencia del Genoma, compuesto entre otros por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI-NIH) y el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI). La versión actual de ensamblado es la GRCh38/hg38/hg19, de 2013 ⁷⁸. Nuevas subversiones van siendo publicadas siendo que la próxima actualización del ensamblaje (GRCh38.p14) está prevista su publicación para la primavera de 2020 (“Human Genome Overview - Genome Reference Consortium,” accedido 2020).

El método de ensamblaje preferencial cuando se conoce el genoma de referencia es el alineamiento de la lectura de secuencia contra ese genoma y para esto se han desarrollado diversos algoritmos de mapeo. Estas herramientas localizan la ubicación en la secuencia de referencia que coincida con la lectura, tolerando un cierto número de desajustes para permitir la detección de variación. Presentan una sensibilidad y especificidad de >99,5% para detección de SNPs y 95% para INDEL ^{80,81}. Entre estos algoritmos los más utilizados para realizar alineamientos de lecturas cortas, son el *Burrows – Wheeler Aligners* (BWAs) que se usa principalmente para Illumina; mientras que para Ion Torrent, se utiliza el programa de alineación de mapeo de torrents (TMAP) un software optimizado específicamente para esta plataforma ⁷².

Al alinear las lecturas obtenidas con el genoma de referencia, es importante resaltar tres cuestiones fundamentales: al mapear lecturas cortas en un genoma de referencia puede haber un problema de ambigüedad, que en algunos casos se puede superar con el uso *paired-end reads*; no se consideran las lecturas con muchas discrepancias lo que significa descartar las variantes que solo son compatibles con dichas lecturas; y las tecnologías de segunda generación, que incorporan la PCR en la preparación de bibliotecas, lleva a que se pueden secuenciar varias lecturas que se originan en

una secuencia de molde única, lo que interfiere con la variable estadística y, por lo tanto, se tienen que eliminar los duplicados de PCR después del alineamiento del genoma completo ⁷⁰.

Después del alineamiento, se recomienda a volver a procesar las lecturas para aumentar la precisión de la variante leída y la calidad de la misma disminuyendo artefactos del alineamiento ⁸². SAMtools ⁸³, Genome Analysis Toolkit (GATK) ⁸⁴ y Picard (“Picard Tools - By Broad Institute,” accedido en 2020) son algunas de las herramientas bioinformáticas utilizadas para realizar este procesamiento posterior a la alineación. La nueva información se organiza en archivos con el formato de *Sequence Alignment Map* (SAM), que almacena los datos de alineamiento de lectura con la del genoma de referencia. El formato *Binary Alignment Map* (BAM) es la versión comprimida en formato binario del archivo SAM ⁷¹.

1.4.1.2.2. Llamada de variantes

La identificación de variantes es el paso que sigue a la alineación de las lecturas y depende de la referencia a la que se alinean estas mismas lecturas. En esta etapa, se identifican la localización, el tipo y el contenido de variantes específicas de un genoma individual dado ⁸⁶. Hay varias herramientas disponibles para la llamada de variantes que difieren en metodología. Algunas identifican variantes basándose en el número de llamadas de base de alta calidad que no están de acuerdo con la posición de interés del genoma de referencia; y otras usan métodos estadísticos bayesianos, de probabilidad usando parámetros, como valores de calidad de base y mapeo, para identificar diferencias de variantes ⁷². SAMtools, GATK y Freebayes son las herramientas más utilizadas para los datos obtenidos de Illumina ⁸⁷. Ion Torrent tiene su propio software conocido como *Torrent Variant Caller*. La mayoría de estas herramientas utilizan el formato SAM / BAM como entrada de los

datos y generan un archivo de salida formato de llamada variante (VCF – *Variant Calling Format*)⁸⁸. El formato VCF es un archivo de formato estándar, desarrollado por proyectos de secuenciación como el proyecto 1000 genomas, creado para almacenar información sobre las variantes detectadas de forma compacta y de fácil acceso⁸⁹.

1.4.1.3. Análisis terciario

En este paso es donde se interpreta y analiza toda la información obtenida en la secuenciación. Es cuando se abre la posibilidad de establecer la relación entre la información genética de un individuo y el fenotipo observado. El análisis terciario empieza con la anotación de variantes con información adicional para predecir el impacto funcional de las mismas. La anotación es seguida por un filtrado de variantes y priorización. Para todos estos procesos se usan varios softwares combinados que son actualizados frecuentemente, una dinámica extremadamente importante para incluir hallazgos científicos recientes.

1.4.1.3.1. Anotación de las variantes

Los archivos VCF contienen información detallada sobre el contexto de una variante determinada, como la posición genómica, referencia del gen, su posición dentro del gen, el impacto de la variación (*missense*, *nonsense*, sinónimo, stop-loss, etc.). Dada la gran cantidad de datos, la anotación de variantes es automática y actualmente hay varias herramientas disponibles, cada una con diferentes metodologías. La mayoría de las herramientas pueden realizar tanto la anotación de SNP como la de INDEL, mientras que la anotación de SV o CNV son más complejas⁹⁰. Las dificultades que enfrenta el proceso de identificación de variantes están relacionadas con el análisis de regiones genómicas repetitivas; la identificación de la fase del locus, es decir, el origen materno o paterno (importante en estudios de correlación genotipo-fenotipo); y la evaluación de la cobertura de la secuencia, ya que si una variante

no es identificada en un número significativo de lecturas debería ser descartada, lo que puede llevar a que se excluyan algunos positivos verdaderos. Además, estas herramientas pueden ofrecer información adicional integrando varios algoritmos permiten calcular las puntuaciones de las consecuencias para cada variante en función de varios parámetros diferentes, como el grado de homología de secuencia, conservación evolutiva, estructura de proteínas o predicción estadística basada en mutaciones conocidas. Las herramientas más usadas para este objetivo son SIFT ⁹¹, PolyPhen-2 ⁹², CADD ⁹³ y Condel ⁹⁴.

Uno de los programas más ampliamente utilizado en la anotación de variantes es ANNOVAR que puede identificar SNP, INDEL y CNV ⁹⁵. Este algoritmo utiliza bases de datos de anotaciones de UCSC, Ensembl o cualquier dato de anotación que se convierta al formato Genérico de Características 3 (GFF3), el formato de texto que representa las anotaciones utilizadas por ANNOVAR ⁷¹, anota los efectos funcionales de las variantes con respecto a los genes y otros elementos genómicos y compara las variantes con las bases de datos de variaciones existentes, y subconjuntos de variantes que no se informan en bases de datos públicas, lo cual es importante especialmente cuando se trata de variantes raras que causan enfermedades mendelianas ⁹⁶. El acceso a toda la información adicional puede ser un recurso para las bases de datos de variantes de enfermedades como ClinVar y HGMD, donde se recupera información sobre la asociación clínica a la variante.

1.4.1.3.2. Filtrado y Priorización de variantes

Después de la anotación de un archivo VCF el número total de variantes es enorme variando su número dependiendo de si se trata de secuenciación de regiones específicas del exoma, el exoma o el genoma completos. Así, para identificar las variantes que causan la enfermedad, se requieren algunas estrategias de filtrado.

Se ha realizado un control de calidad en pasos anteriores para la correcta llamada de variante, pero todavía hay podrían existir variantes positivas falsas debido a artefactos o errores de lectura. Para un nuevo filtrado de calidad de las variantes identificadas se debe tener en cuenta otros factores como el número total de lecturas independientes y el porcentaje de lecturas que muestra cada variante. El umbral de los datos observados es definido por el genetista siendo que las variantes con menos de 10 lecturas independientes son descartadas ya que es probable que se deba a un sesgo de secuencia o una baja cobertura ⁷².

Otro filtro frecuentemente empleado es la de la frecuencia de determinada variante en la población. La frecuencia alélica menor (MAF), una de las variables utilizadas para filtrar en función de la frecuencia alélica, y permite clasificar las variantes en tres grupos: variantes raras (MAF <0.5, generalmente asociadas a enfermedades mendelianas), variantes frecuentes bajas (MAF entre 0.5% y 5%) y variantes comunes (MAF > 5%) ⁵³. Las bases de datos de población, tales como el proyecto de 1000 genomas ⁹⁷, el Consorcio de agregación de exomas (ExAC) ⁶² y la Base de datos de agregación de genomas (“GnomAD Resource Introduced at ASHG Meeting, Doubles ExAC Dataset,” accedido en 2020) son las bases de datos más utilizadas para determinar la frecuencia alélica. Aunque de bstante utilidad, la aplicación de este método para análisis de las frecuencias en la población tiene sus limitaciones y podría causar una exclusión errónea. Por ejemplo, en el caso de portadores de variantes en genes de trastornos recesivos que no muestran signos de la enfermedad, y la frecuencia de los alelos dañinos en las bases de datos de variantes poblacionales puede ser mayor que el umbral establecido para dicha enfermedad recesiva.

Para la priorización e interpretación de las variantes filtradas, se emplean los criterios estandarizados para la evaluación de variaciones genómicas obtenidas a través de NGS, como las guías aprobadas del Colegio Americano de Genética y Genómica Médica (ACMG) y la Sociedad Europea de Genética Humana ^{98,99}.

1.5. APLICACIÓN DE LA NGS EN LA CLÍNICA

Con las tecnologías NGS todo el panorama de las pruebas genéticas en el entorno clínico ha cambiado. Se ha convertido la secuenciación genómica a gran escala en una herramienta de diagnóstico genético de rutina en la clínica, particularmente para enfermedades heterogéneas desde el punto de vista del diagnóstico genético, como algunos errores congénitos del metabolismo o enfermedades del neurodesarrollo ¹⁰⁰ y su implementación en laboratorios de investigación en todo el mundo ha llevado a un aumento sustancial en la identificación de nuevos genes asociados a enfermedad ¹⁰¹.

Actualmente se discute sobre el potencial del estudio del genoma, exoma o paneles genéticos en un contexto clínico y cual es el enfoque más apropiado mediante una sospecha de enfermedad ¹⁰². Los principales factores que contribuyen a la decisión de la implementación de una prueba basada en NGS son el conocimiento que se tiene sobre la enfermedad, el tiempo de respuesta y el coste de la prueba. La decisión y aceptación de las pruebas genéticas basadas en NGS va a depender de una demostración clara de los beneficios para el paciente. Además, de que es necesario tener claro que los resultados son precisos suficientemente para respaldar el diagnóstico de la enfermedad ¹⁰³. Otro factor importante que debe tenerse en cuenta al analizar las opciones de implementación de NGS en el diagnóstico es la rentabilidad. En la asistencia sanitaria, la elección de una tecnología particular debe justificarse mostrando un beneficio adicional significativo. Aunque una tecnología dada puede tener un rendimiento mayor en comparación con las alternativas, las diferencias en los costes pueden limitar la implementación del enfoque "superior". Sin embargo, a medida que la tecnología de secuenciación mejora rápidamente y los costes se abaratan, una tecnología que actualmente se podría considerar insuficientemente rentable puede llegar a serlo en el futuro cercano.

Cada vez es más abundante el conocimiento sobre la relación entre variantes genéticas y enfermedad, lo que hace que sea más fácil la clasificación de las variantes en función de su potencial

implicación en el fenotipo de un paciente. Aun así, en muchos casos, no es posible alcanzar una clasificación definitiva de las variantes que nos lleven a un diagnóstico genético definitivo. La búsqueda del diagnóstico se ha descrito como una odisea para las familias donde los padres de los niños con trastornos genéticos raros buscan respuestas que les ayuden en la aceptación de su situación, el apoyo social, el tratamiento y el pronóstico ¹⁰⁴.

Existen tres enfoques de la NGS para mejorar el diagnóstico de enfermedades humanas: enriquecimiento dirigido de un conjunto de genes (panel de genes), secuenciación del exoma completo (WES) y secuenciación del genoma completo (WGS).

1.5.1. Paneles genéticos

Una de las estrategias empleadas es el diseño de paneles genéticos específicos para una determinada patología que reúne ciertos genes candidatos para estudio. La decisión del tipo de panel es basada en una sospecha diagnóstica, como, por ejemplo, en el caso de las enfermedades neurometabólicas, las cuales son patologías heterogéneas genéticamente y con una presentación clínica variada, incluyendo muchas veces fenotipos poco comunes en los estadios tempranos de la enfermedad ¹⁰⁵. La decisión sobre el panel de genes a estudiar se basa en el fenotipo clínico y en las demás pruebas analizadas previamente, como estudios bioquímicos y de neuroimagen. El tiempo de respuesta en patologías con pronóstico severo es crucial, principalmente en aquellas donde están disponibles tratamientos para manejar la enfermedad y cambiar su curso.

En este método se enriquecen las regiones codificantes y las regiones de *splicing* de interés para un determinado grupo de enfermedades y son útiles para diagnosticar trastornos monogénicos hereditarios bien definidos. Son varias las ventajas de este método: el coste reducido del método cuando comparado con WES o WGS, el enriquecimiento dirigido y su posterior

secuenciación proporcionan una calidad superior y una profundidad de lectura mayor que WES o WGS¹⁸ y el análisis de los datos al ser más restringida disminuye la complejidad de su análisis e interpretación, contribuyendo a tiempos de respuesta reducidos¹⁰⁶. Otra ventaja es la minimización del problema de hallazgos incidentales, aumentado la disposición de los pacientes y sus familias a participar activamente en las pruebas diagnósticas¹⁰⁷. Sin embargo, una de las dificultades asociadas a este método es la selección específica de genes que deben estar incluidos en un determinado panel, de hecho, paneles diseñados por distintos laboratorios para el mismo grupo de patologías muestran diferencias cuanto al contenido de genes incluidos. Debido a esto, el ACMG ha aprobado recientemente guías estandarizadas que dirigen los aspectos técnicos para el diseño de paneles¹⁰⁸. Además, la rápida velocidad de descubrimiento de nuevos genes asociados a enfermedad implica que estos paneles sean rediseñados y reevaluados frecuentemente.

Varios paneles genéticos han sido empleados con éxito en el diagnóstico de enfermedades raras con heterogeneidad genética, incluyendo heterogeneidad alélica¹⁰⁹, de locus¹¹⁰, fenotipos sobrepuestos¹¹¹ y en genes asociados a vías comunes de determinadas enfermedades¹¹². Específicamente para los errores congénitos de metabolismo, varios estudios defienden el uso de los paneles genéticos para la identificación del defecto molecular de este tipo de enfermedades presentado tasas de diagnóstico muy alentadores y con tiempos de respuesta reducidos. En 2015, el Grupo Saudi Mendeliome ha presentado los resultados de análisis de un grupo de pacientes con sospecha de enfermedad mendeliana estudiados por panel de genes donde han obtenido una sensibilidad clínica diagnóstica en 43% de los casos¹¹³. En otro estudio para el diagnóstico de enfermedades neurometabólicas complejas se ha descrito una tasa de diagnóstico en 53% de los casos mediante uso de paneles genéticos dirigidos según la presentación clínica del paciente¹⁰⁵.

El estudio por panel de genes ha ganado popularidad y son utilizados por muchos laboratorios clínicos en la investigación de una amplia gama de condiciones genéticamente heterogéneas. Su rendimiento diagnóstico se basa esencialmente en el conocimiento que se tiene sobre determinada enfermedad, sin embargo, con la disminución de los costes de las tecnologías NGS, el WES y WGS probablemente reemplazarán el uso de paneles genéticos en el entorno de diagnóstico clínico en el futuro. No obstante, quedan muchos desafíos antes de esta implementación, incluidas las dificultades para interpretar cantidades enormes de datos generados e incertidumbres sobre los hallazgos clínicamente reportables.

1.5.2. Secuenciación Completa del Exoma (WES) versus Secuenciación Completa del Genoma (WGS)

La secuenciación completa del exoma (WES) / genoma (WGS) suelen ser aplicados en los casos en que no fue posible obtener un diagnóstico concluyente en pruebas convencionales y en test genéticos basados en paneles. Se podría justificar también en respuesta al diagnóstico de aquellas enfermedades en que el papel genético no es claro todavía ya que el conocimiento de las bases moleculares adyacentes es aún limitado.

El WES se ha descrito de gran utilidad para inferir sobre regiones codificantes del genoma humano que corresponden a alrededor de 1% de todo el genoma (“ENCODE,” accedido en 2020), permitiendo el análisis a un mayor número de genes que no estarían incluidos en el diseño de los paneles genéticos, sin embargo, es probable que su representación sea incompleta ya que puede ocurrir que determinados exones no son incluidos en el diseño de captura, y la baja cobertura de las lecturas de nucleótidos en exones específicos puede ser influida muchas veces por el alto contenido en GC¹¹⁵. El WES puede incluso alcanzar profundidades de lectura considerablemente más altas y a un coste más bajo comparado con WGS (revisión publicada resultado de la tesis, Fernandez-

Marmiesse *et al.*, 2018).; además, hay que tener en cuenta que alrededor del 10% de las bases leídas por WES no llegan a una profundidad de lectura de 20x, requisito mínimo para validación de las mismas ¹¹⁷. Estos factores pueden llevar a la no detección de variaciones genómicas que podrían estar relacionadas con la enfermedad como INDEL, SV y CNVs. El WGS se usa para determinar la secuencia completa de ADN de un paciente, incluyendo regiones codificantes y no codificantes, y regiones reguladoras e intergénicas del genoma pero se necesitan grandes cantidades de número de lecturas de secuenciación para conseguir obtener una cobertura de lectura fiable, y esto puede ser un factor limitante en el número de muestras a analizar durante la técnica.

En ambos métodos se puede inferir sobre la implicación de nuevos genes en la enfermedad, revelando la posibilidad de identificar diversos tipos de variantes genéticas que podrían llevar a una identificación más precisa de las patogénicas para dirigir el diagnóstico y el tratamiento. Así lo demostraron un grupo de la Universidad de Washington del Centro Genómico Mendeliano, en que estudiaron a cuatro pacientes, con la misma presentación clínica y no relacionados entre sí, y por análisis de WES identificaron un nuevo gen candidato al síndrome de Miller, el *DHODH* ¹¹⁸. Por otra parte, el estudio por WES ha incrementado el rendimiento diagnóstico en pacientes con sospecha de enfermedad genética ¹¹⁹, en pacientes con fenotipos de enfermedades superpuestas ¹²⁰ e incluso se propone como test de primera línea en el ámbito clínico ¹²¹. Estudios recientes describen las tasas de diagnóstico del WES alrededor de 36% en pacientes con enfermedades del neurodesarrollo, 43% en pacientes con sospecha de enfermedad neurometabólica y 25% en pacientes con distonías ¹²². El uso del WES/WGS permiten además la identificación de variantes *de novo* en análisis en trio de padres-pacientes para enfermedades heterogéneas, como en las enfermedades de neurodesarrollo ¹²³. Estudios con WGS han reportado incluso una tasa de diagnóstico mayor que el WES ¹²⁴. En un estudio reciente de una cohorte de pacientes el análisis por WGS ha detectado las mismas variantes que en WES, pero en 9 de los 35 participantes han detectado variantes

que podrían justificar el diagnóstico y que no estaban incluidas en los datos del WES. Estas incluían SNP intrónicos, pequeños CNVs, variantes en ARN no codificante, ADN mitocondrial y SNP en regiones codificantes que presentaban poca cobertura en el WES.

Una de las mayores ventajas y limitaciones del WES/WGS es el acceso y almacenamiento de una gran cantidad de información genómica, incluso completa, la cual queda disponible para posteriores análisis rápidos e intensivos de un paciente. Por un lado, la disponibilidad de esta información permite la reanálisis de los datos de secuenciación de un paciente, dinámica cada vez más necesaria para acompañar la velocidad a que avanza el conocimiento genómico ¹²⁵. Esto permite una evaluación sistemática de las variantes inicialmente identificadas y su categorización cuanto a la patogenicidad cambiar en resultado de estudios que van siendo publicados. Hay también varios estudios clínicos publicados apoyando la utilidad diagnóstica rápida del WGS en neonatos con patologías severas y en estado crítico, ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos, con una tasa de diagnóstico considerablemente alta que varía entre el 42 a 57%, y en 30 a 72% de los casos los resultados genéticos llevaron a cambios en el tratamiento médico ¹²⁶⁻¹³⁰. Hay que tener en cuenta que, aunque es secuenciado todo el genoma de los pacientes, el análisis y priorización de las variantes se suele restringir, al fenotipo presentado por el paciente, a través del cual y mediante uso de plataformas como el *Human Phenotype Ontology* (HPO) o *Genetic Testing Registry* (GTR – NCBI) el análisis se restringe a un conjunto de genes candidatos y bien caracterizados, lo cual sería como analizar las regiones codificantes de un panel de genes diseñado virtualmente. Esto sucede porque hay que garantizar que la información extrapolada del análisis por WGS es interpretada correctamente para el diagnóstico del neonato en estado crítico, y esto solo es posible si está bien caracterizada en la literatura y bases de datos científicas.

Sin embargo, la enorme cantidad de información obtenida exige una gran disponibilidad de herramientas bioinformáticas potentes y de una gran capacidad de análisis para filtrar los datos según sean

variantes posiblemente causadoras de enfermedad. Se pueden obtener una gran cantidad de hallazgos incidentales por la detección, por ejemplo, de una variante conocida/ no conocida en un gen asociado a una enfermedad que no coincide con el fenotipo clínico del paciente y/o detección de una variante no conocida en un gen no asociado previamente a ninguna enfermedad ¹³¹. Por ejemplo, el proyecto BaySeq fue el primer ensayo clínico aleatorizado diseñado para examinar la mejor forma de utilizar el WES como herramienta en la detección de posibles patologías en neonatos ¹³². El estudio ha incluido a 325 familias, de las cuales 257 tenían bebés sanos en y 68 en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Sin embargo, durante el análisis de variantes fueron detectados hallazgos incidentales como variantes posiblemente patogénicas en genes asociados con patologías en adulto como cáncer de mama y ovario o el síndrome de Lynch (*BRAC1*, *BRAC2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*). Estos hallazgos al entrar dentro de la lista de genes considerados con impacto clínico severo aprobada por la ACMG, fueron reportados en el informe y la familia informada, si así lo ha aceptado mediante consentimiento informado antes del estudio. Los aspectos éticos de los hallazgos incidentales están en debate en la comunidad científica y clínica donde se han desarrollado prácticas éticamente aceptables para el manejo de esta información ¹³³.

1.6. ENFERMEDADES GENÉTICAS

Las enfermedades mendelianas son raras tomadas de forma individual, pero en su conjunto tienen una tasa de 40 a 82 por cada 1.000 nacimientos, con una estimación anual de 7.9 millones de niños diagnosticados de un trastorno genético ¹³⁴. Hasta el 24 de febrero de 2020 se han incluido 5740 enfermedades de base genética conocida en la base de datos OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <https://omim.org/>). Estas patologías tienden a aparecer en familias, aunque también pueden ser causadas por eventos *de novo* ¹³⁵. Dependiendo del mecanismo patológico, el fenotipo clínico de un paciente se podrá manifestar de manera dominante o recesivo ¹³⁴.

Los estudios de enfermedades monogénicas, tanto de herencia autosómica recesiva como la fenilcetonuria, o enfermedades dominantes como la paraparesia espástica ¹³⁶, revelan variantes en genes específicos para la aparición y transmisión de la enfermedad. Sin embargo, muchos de los fenotipos de la enfermedad Mendeliana pueden ser genéticamente heterogéneos. Las enfermedades como la retinitis pigmentosa tienen más de 40 genes con variantes causales identificadas. Además, las variantes específicas pueden llevar a un determinado fenotipo según sean en homocigosis, en heterocigosis o en heterocigosis compuesta ¹³⁷. Por lo tanto, incluso cuando existen patrones simples de herencia en enfermedades con un curso patológico bien caracterizado, los eventos mutacionales subyacentes deben identificarse para obtener un diagnóstico molecular preciso. De hecho, la tecnología NGS ha permitido el estudio de muchos cambios monogénicos ya descritos.

Aunque las enfermedades mendelianas son típicamente raras y tienen patrones de herencia predecibles, las enfermedades complejas son comunes en la población general y resultan de la interacción de varios loci de susceptibilidad y factores ambientales. Sin embargo, la heterogeneidad y la penetrancia incompleta que se percibe hacen sugerir que la distinción tradicional entre enfermedades mendelianas y complejas no siempre es absoluta ¹³⁸.

Con esto ha surgido un interés creciente en el estudio de enfermedades complejas. Se han propuesto dos modelos distintos que dirigen el análisis de variantes en enfermedades complejas ¹³⁹. El modelo, inicialmente seguido, reside en la hipótesis "Variación común - Enfermedad común", en la que los fenotipos complejos son el resultado de los efectos acumulativos de una gran cantidad de variantes comunes. Según este modelo, el conjunto de 10 a 15 millones de SNP, CNV y otras variantes, que son comunes en la población, están modulados por la presencia de factores ambientales en términos de herencia. La aplicación del GWAS permitió identificar una serie de asociaciones entre variantes comunes y fenotipos complejos que apoyan este modelo ¹⁴⁰. Sin embargo, la pérdida de heredabilidad verificada por las variantes encontradas

llevó a la necesidad de encontrar un modelo alternativo para detectar variantes causales de las condiciones evaluadas ⁵⁵. Este modelo alternativo se centró en la hipótesis de "Variación rara - Enfermedad común", y argumenta que la susceptibilidad genética a enfermedades complejas se debe al riesgo acumulativo conferido por múltiples variantes raras en el genoma de un individuo, por lo que es probable que las variantes no sean detectadas por estudios de variantes comunes. El estudio de las frecuencias más bajas de variantes raras es posible mediante el análisis del genoma secuenciado ¹⁴¹. Se prevé que el genoma humano contiene cerca de 40.000 a 200.000 variantes raras que se observan en menos del 0.5% de la población ⁹⁷.

1.6.1. Enfermedades Minoritarias

Las enfermedades minoritarias, llamadas también de "huérfanas" o "raras" se definen, en función de su prevalencia, como aquellas patologías que afectan a un número bajo de personas en una población. El límite a partir del cual se considera minoritaria una enfermedad es variable, en la Unión Europea se define una enfermedad rara cuando el número de sujetos afectados es menor de 5:10.000, mientras que en los EEUU este límite es de 200.000 en total ¹⁴². Frecuentemente se tratan de patologías crónicas, debilitantes, asociadas a discapacidad y a una disminución en la esperanza de vida. La mayoría de los pacientes con enfermedades minoritarias son pediátricos (50%-70%), y en el 30% de estos casos fallecen antes de los 5 años de edad ¹⁴³. Aunque de una manera individual son enfermedades poco frecuentes, en conjunto su prevalencia es alta, habiéndose estimado una prevalencia global de hasta 1:12.5 ¹⁴⁴.

En muchos casos el desconocimiento de la historia natural de una enfermedad y de su base molecular dificulta y confunde su diagnóstico. La estimación de un diagnóstico preciso de una enfermedad rara es de aproximadamente 5 años y engloba una gran disponibilidad de recursos ¹⁴³. De la misma manera que el diagnóstico de enfermedades comunes se basa en la presentación

clínica del paciente, lo mismo ocurre en el diagnóstico de enfermedades raras, sin embargo, en este último caso suele suceder que los síntomas están enmascarados por condiciones comunes. Además, la pleiotropía genética hace que el diagnóstico sea aún más complejo. Desde el punto de vista médico, su labor en descifrar la enfermedad es un proceso difícil en la medida en que puede solicitar determinadas pruebas histológicas o bioquímicas que no están directamente asociadas a la enfermedad rara ya que estas tampoco se pueden clasificar en función de las características histológicas y patológicas estándar debido a su heterogeneidad fenotípica. La falta de experiencia con este tipo de patologías y la falta de casos descritos en la literatura científica puede ser un obstáculo importante en el diagnóstico. Como consecuencia, los pacientes y sus familiares viven una odisea de pruebas diagnósticas, seguimiento por diferentes especialidades médicas, y que conduce en muchas ocasiones a un manejo inapropiado de la enfermedad que sigue evolucionando sin alcanzar un diagnóstico. La epidemiología y la inmigración son factores que pueden determinar también el impacto de una enfermedad rara. Una enfermedad determinada puede ser rara en un área geográfica, mientras que su prevalencia puede ser mucho mayor en otra región, como es el caso de la talasemia, con una alta prevalencia en regiones mediterráneas y asiáticas ¹⁴⁵.

El desarrollo de la tecnología NGS ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de este grupo de enfermedades, permitiendo que su aplicación en la clínica y la identificación de la causa molecular en muchas de ellas pueda llevar a opciones terapéuticas eficientes con los resultados obtenidos ¹¹⁶. Ejemplo de esto es el caso de Nicholas Volker, conocido como el primer caso tratado en base a los resultados de secuenciación de su ADN ¹⁴⁶. Nicholas Volker a los dos años de edad desarrolló síntomas severos asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal. Después de varios tratamientos fallidos, en 2009 el genetista Howard Jacob y su equipo, secuenciaron el genoma de Nicholas en un último intento de determinar la causa molecular que podría estar detrás de su patología. Identificaron una variante patogénica en el gen XIAP, previamente asociado con inmunodeficiencia. Se le realizó un

trasplante de células madre procedentes de la sangre de cordón umbilical que permitió corregir la enfermedad ¹⁴⁷.

1.6.1.1. Errores Congénitos del Metabolismo – ECM

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) son trastornos genéticos poco frecuentes que aunque individualmente son raros, colectivamente son comunes en la población ¹⁴⁸. El término ECM fue utilizado por primera vez en 1902 por Archibald Garrod, al describir una clase de enfermedades genéticas hereditarias causadas por variantes en genes que codifican proteínas con una función vital en el metabolismo ¹⁴⁹. Son enfermedades raras donde en una reciente revisión sistemática Waters refiere una prevalencia de 50.9 por 100 000 nacimientos vivos (Waters *et al.*, 2018).

Los ECM se producen debido a un defecto enzimático en las vías bioquímicas implicadas en el metabolismo de las proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y cofactores, compuestos nitrogenados y otros, resultando en la acumulación de sustratos tóxicos o en el déficit de metabolitos esenciales. Estos defectos se pueden presentar clínicamente de una forma muy variada, con implicación de problemas crónicos como sería el déficit en el neurodesarrollo, descompensaciones metabólicas agudas como la acidosis metabólica neonatal o la hipoglucemia severa resistente al tratamiento ¹⁵¹. La edad de presentación puede variar desde la infancia hasta la adolescencia o incluso la edad adulta, y las formas más severas suelen presentarse en la primera infancia con una mortalidad aún significativa ¹⁵².

Estas enfermedades no son tan diferentes a las enfermedades comunes ya que a menudo el espectro fenotípico que presentan puede correlacionar poco con la severidad de las variantes que causan la enfermedad. Varios factores ambientales, epigenéticos, así como genes modificadores, pueden contribuir a la enfermedad contribuyendo a la idea de *una enfermedad-un gen*, ya que la mayoría de los ECM son de base monogénica. Esto implica que los

fenotipos emergen de un conjunto de propiedades entre los cuales están el efecto de polimorfismos en genes determinados en interacción con el funcionamiento de las redes biológicas.

Los desafíos al diagnosticar los trastornos neurometabólicos son en gran parte atribuibles a la heterogeneidad clínica y genética (incluidas en las presentaciones clínicas que son a menudo inespecíficas o atípicas al principio del curso de la enfermedad) y la falta de conciencia clínica de entidades raras. Los pacientes con sospecha de enfermedad metabólica hereditaria y por tanto también neurometabólica son remitidos con frecuencia a centros especializados donde precisan a menudo someterse a múltiples pruebas diagnósticas. A pesar de esto, comúnmente se encuentran retrasos en el diagnóstico o dificultades para establecer un diagnóstico definitivo, y varios de estos pacientes permanecen sin diagnosticar ¹⁵³.

El diagnóstico temprano de la enfermedad neurometabólica es crucial, especialmente para aquellos trastornos que son tratables o manejables, con un inicio temprano del tratamiento que a menudo resulta en mejores resultados. La secuenciación de próxima generación (NGS) ha revolucionado el enfoque diagnóstico ¹⁵⁴ y ha ayudado a reducir la cantidad de pruebas necesarias para establecer un diagnóstico.

1.6.1.1.1. Hipoglucemia e Hiperglucemia

El hiperinsulinismo familiar se caracteriza por una hipoglucemia que puede aparecer en el período neonatal o posterior durante la infancia y la presentación de la enfermedad puede variar bastante incluso dentro de una familia. El hiperinsulinismo congénito aislado es la causa más común de hipoglucemia grave y persistente en el período neonatal. La prevalencia se ha estimado en 1: 50.000 nacimientos vivos, con mayor prevalencia en ciertas poblaciones genéticamente más homogéneas ¹⁵⁵. En la mayoría de

los pacientes con hiperinsulinismo familiar fueron identificadas variantes en el gen *ABCC8*, aunque un porcentaje pequeño presenta también variantes en los genes *KCNJ11*, *GLUD1* y *HFN1A* ¹⁵⁶.

La diabetes monogénica representa el 1-2% de todos los casos de diabetes mellitus ¹⁵⁷. Los fenotipos principales que sugieren una causa monogénica subyacente incluyen diabetes mellitus neonatal, diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY) y otros síndromes asociados con diabetes muy raros. La diabetes mellitus neonatal permanente es una forma monogénica de diabetes neonatal caracterizada por hiperglucemia persistente en los primeros 6 meses de vida en general, que requiere tratamiento continuo con insulina. Las manifestaciones clínicas iniciales incluyen hiperglucemia, glucosuria, retraso del crecimiento intrauterino, poliuria osmótica, deshidratación severa y no ganancia ponderal ¹⁵⁸. La forma transitoria de diabetes mellitus neonatal generalmente se resuelve a los 18 meses de edad. Muchos pacientes muestran algún grado de trastorno de coordinación del desarrollo. La incidencia de diabetes mellitus neonatal se estima en 1: 100.000 a 1: 300.000 nacimientos vivos ¹⁵⁹. Alrededor del 50% de los casos de diabetes mellitus neonatal son permanentes y el 50% son transitorios. La diabetes neonatal es causada más comúnmente por variantes en los genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS* y *GCK* ¹⁶⁰. Las manifestaciones clínicas difieren según el defecto genético subyacente. En los casos relacionados con *KCNJ11* y *ABCC8*, los pacientes generalmente se presentan antes de los tres meses de edad con hiperglucemia sintomática y, a menudo, cetoacidosis. Algunos pacientes con variantes en el gen *KCNJ11* tienen hallazgos neurológicos relacionados, que incluyen retraso del desarrollo y epilepsia (síndrome DEND) o una forma más leve de DEND sin convulsiones y con un retraso del desarrollo menos grave ¹⁶¹.

1.6.1.1.2. *Metabolismo Intermediario*

Casi todos los ECM del Metabolismo Intermediario tienen marcadores metabólicos en plasma y orina (pequeñas moléculas difusibles solubles en agua) que se pueden medir fácilmente (como aminoácidos, ácidos orgánicos, acilcarnitinas) o mediante el uso de otros métodos (como metales o metabolitos de galactosa). En este grupo, los trastornos del metabolismo intermediario se pueden dividir en dos subcategorías dependiendo de si el fenotipo se debe principalmente a una acumulación o una deficiencia.

1. *Enfermedades de moléculas pequeñas vinculadas a una acumulación de compuestos.* Estos causan trastornos agudos o progresivos de "intoxicación". Los signos y síntomas resultan principalmente del acúmulo anormal de compuestos. No interfieren con el desarrollo neurológico embrionario y fetal y se presentan después de un intervalo sin síntomas (días a años) con signos clínicos de "intoxicación" (aguda, intermitente, crónica e incluso progresiva: neurodegeneración) provocados por el ayuno, catabolismo, fiebre, enfermedades intercurrentes e ingesta de alimentos. La mayoría de estos trastornos son tratables y requieren la eliminación de la "toxina" por dietas especiales, y cofactores.

Este grupo abarca los ECM del catabolismo de aminoácidos (fenilcetonuria, enfermedad de orina de jarabe de arce, homocistinurias), defectos del ciclo de la urea, acidurias orgánicas (como metilmalónica, propiónica, isovalérica, aciduria glutárica tipo 1), galactosemias, acumulación de metales (como enfermedad de Wilson, neuroferritinopatías y síndromes de acumulación de hierro en el cerebro, o síndrome de distonía por cirrosis con hipermanganesemia)¹⁶².

En el cerebro, las moléculas que se acumulan pueden comportarse como neurotransmisores en el caso de los aminoácidos o estimular vías biológicas relacionadas con la autofagia deteriorada y los factores del crecimiento nervioso. La plasticidad sináptica y la excitabilidad se deterioran casi

constantemente y las funciones ejecutivas son especialmente vulnerables. Por lo tanto, y a pesar de un control metabólico adecuado, la mayoría de estos pacientes muestran dificultades de aprendizaje, conductuales y emocionales ¹⁶³.

2. *Enfermedades de moléculas pequeñas vinculadas a una deficiencia.* Este grupo incluye todos los defectos de moléculas esenciales que deben transportarse a través de las membranas celulares, como los errores innatos del transporte de aminoácidos y la síntesis de ácidos grasos. Uno de los ECM más paradigmático relacionado es la deficiencia de SLC7A5 que resulta en el transporte defectuoso de los ácidos ramificados ¹⁶⁴ y la deficiencia de MFSD2A que resulta del transporte defectuoso de los ácidos grasos esenciales, como el ácido docosahexanoico ¹⁶⁵. Curiosamente, la rara deficiencia de deshidrogenasa quinasa de cadena ramificada, que sobreactiva la oxidación irreversible de BCAA, causando niveles muy bajos de BCAA como en las variantes SLC7A5, presenta un síndrome neurológico igualmente devastador con alteración del desarrollo neurológico ¹⁶⁶.

Los síntomas resultan principalmente de la síntesis defectuosa de compuestos que están distales del bloqueo o del transporte defectuoso de una molécula esencial a través del epitelio intestinal, la barrera hematoencefálica y las membranas citoplasmáticas u orgánicas. Los signos clínicos son, al menos en teoría, tratables al proporcionar el compuesto faltante. La mayoría de estos defectos causan una alteración del desarrollo neurológico, tienen una presentación congénita y pueden presentarse como defectos de nacimiento.

1.6.1.1.3. ECM Mitocondriales

Generalmente se trata de enfermedades con presentaciones clínicas muy graves y con mal pronóstico. Los genes asociados hasta

ahora como causantes de la enfermedad mitocondrial se pueden dividir en aquellos que tienen un papel principal específico de la biogénesis del sistema OXPHOS (Sistema de Fosforilación Oxidativa Mitocondrial), y aquellos cuyo impacto en OXPHOS es indirecto o involucra otras funciones celulares ¹⁶⁷.

Según su función, los genes implicados en enfermedad mitocondrial codifican proteínas que se pueden agrupar en 6 grupos:

1) Subunidades y factores de ensamblaje y de los complejos del sistema OXPHOS

2) mantenimiento de ADNmt

3) expresión de ADNmt

4) cofactores enzimáticos

5) homeostasis mitocondrial y control de calidad

6) metabolismo general.

Las manifestaciones cerebrales de las enfermedades mitocondriales son muy frecuentes y cubren una gran variedad de características clínicas postnatales tempranas o de inicio tardío en adultos, incluyendo convulsiones, encefalopatía, ataxia, espasticidad, distonía, trastornos del movimiento, parkinsonismo, episodios similares a accidentes cerebrovasculares, retraso del desarrollo y / o regresión. y deterioro cognitivo ¹⁶⁸.

Los defectos del metabolismo oxidativo pueden mostrar manifestaciones prenatales como la disgenesia cerebral, atrofia del cuerpo calloso, heterotopía cerebral y cerebelosa, microcefalia, (sistema de piruvato deshidrogenasa, transportador de piruvato, piruvato carboxilasa, fumarasa y otros defectos del ciclo de Krebs) ¹⁶⁹.

1.6.1.1.4. Moléculas Complejas y Leucodistrofias

En este grupo se incluye las enfermedades de moléculas complejas que abarcan esfingolípidos, fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares, glucosaminoglucanos, oligosacáridos, glucolípidos y ácidos nucleicos. Se dividen en dos subgrupos.

1. *Enfermedades de moléculas complejas asociadas a una acumulación.* Los defectos del catabolismo pueden llevar al almacenamiento de un compuesto acumulado visible como los defectos lisosomales clásicos. Son el grupo más típico (como las esfingolipidosis o mucopolisacaridosis) en el que los signos y síntomas resultan principalmente de la acumulación anormal de compuestos y son potencialmente revertidos si se normaliza el acúmulo. Se pueden acompañar frecuentemente de manifestaciones neurológicas con trastornos progresivos de neurodegeneración con o sin signos obvios de "almacenamiento"^{170,171}.

2. *Enfermedades de moléculas complejas asociadas a una deficiencia.* Un ejemplo es defectos que afectan a las P-Ins 3 quinasas (PIK3), una familia de enzimas de señalización que regulan varios procesos que incluyen el crecimiento celular, la proliferación, la migración, el metabolismo, y desarrollo del cerebro. Varios trastornos en este sistema enzimático conducen a los síndromes de megalencefalia-polimicrogiria-polidactilia-hidrocefalia¹⁷². En general, no hay un marcador metabólico y el diagnóstico se basa principalmente en técnicas de genética molecular como la secuenciación dirigida de segunda generación o secuenciación del exoma completo).

La mayoría de los trastornos de síntesis de colesterol pueden presentarse con varias anomalías congénitas y morfogénicas múltiples que incluyen anomalías cerebrales, de órganos internos, esqueléticas o de la piel, y un déficit en el desarrollo psicomotor. La acumulación de sustrato y la consiguiente toxicidad, con o sin deficiencia de colesterol, también explican la diversidad de fenotipos observados. Alternativamente, las anomalías pueden ser atribuibles,

al menos en parte, a una señalización deficiente como se ha sugerido en el síndrome de CK y en el síndrome de Smith Lemli Opitz ¹⁷³. Varios defectos de síntesis de ácidos biliares se presentan como trastornos neurodegenerativos de inicio tardío después de un período sin síntomas seguido de un episodio transitorio de ictericia colestásica neonatal ¹⁷⁴.

Los trastornos peroxisomales son déficits que pueden afectar una enzima matriz específica o una peroxina implicada en la biogénesis de la membrana de peroxisomas. Muchos de los trastornos de la biogénesis del peroxisoma interfieren con el desarrollo neurológico en la vida fetal con un amplio espectro de fenotipos que van desde la severidad del síndrome de Zellweger, con defectos en la migración cortical hasta la una discapacidad intelectual moderada ¹⁷⁵.

Los trastornos congénitos de la glicosilación deben considerarse en cualquier condición clínica sin explicación, particularmente en la enfermedad multiorgánica con afectación neurológica, pero también en situaciones de una discapacidad del desarrollo inespecífica ¹⁷⁶.

Más recientemente se han descubierto muchos defectos que afectan a los sistemas involucrados en el tráfico intracelular, la vesiculación, el procesamiento y el control de calidad de moléculas complejas, como el plegamiento de proteínas y la autofagia, utilizando la secuenciación de segunda generación ¹⁷⁷.

1.6.1.2. Enfermedades Neurológicas

Los trastornos neurológicos son discapacidades asociadas principalmente con el funcionamiento del sistema nervioso central. Trastornos del neurodesarrollo en niños pueden incluir epilepsia, defectos en la morfogénesis cerebral, discapacidad intelectual, defectos neuromusculares, trastornos del movimiento y ciliopatías.

Los niños con trastornos del neurodesarrollo pueden experimentar dificultades con el lenguaje y el habla, habilidades motoras, comportamiento, memoria, aprendizaje u otras funciones

neurológicas. Si bien los síntomas y comportamientos de las discapacidades del desarrollo neurológico a menudo cambian o evolucionan a medida que el niño crece, algunas discapacidades son permanentes. El diagnóstico y el tratamiento de estos trastornos pueden ser difíciles y el tratamiento a menudo implica una combinación de terapia profesional, productos farmacéuticos y programas de apoyo en el hogar y en la escuela.

1.6.1.2.1. Epilepsia

La epilepsia es un trastorno neurológico común con una prevalencia de 5 a 8 por 1000 individuos ¹⁷⁸. Las causas subyacentes a la epilepsia son heterogéneas y pueden ser debidas a una infección, accidente cerebrovascular, trauma, neoplasias y autoinmunidad. Sin embargo, desde hace mucho tiempo que se ha reconocido una base genética para la epilepsia ¹⁷⁹. Las estimaciones de heredabilidad basadas en estudios gemelos respaldan aún más una contribución de la variación genética, aunque las estimaciones de heredabilidad varían considerablemente de 8% a 69% ^{180,181}. El aumento del riesgo familiar se ha explicado tradicionalmente por la herencia multifactorial y la presencia de factores que segregan dentro de una familia determinada ¹⁸². Sin embargo, dentro de estas familias "multifactoriales", existen aquellas familias que segregan la epilepsia como una enfermedad autosómica dominante con penetrancia alta ^{183(p303),184}. Se han identificado varios genes asociados a la epilepsia, entre los más comunes son *SCN1A* (epilepsia genética con convulsiones febriles más [GEFS +]) ¹⁸⁵, *CHRNA4* (epilepsia del lóbulo frontal nocturno) ¹⁸⁶, *KCNQ2* y *KCNQ3* (convulsiones neonatales) ^{187,188} y *SCN2A* (convulsiones infantiles familiares benignas) ¹⁸⁹.

Las encefalopatías epilépticas infantiles de inicio temprano (EIEE) son un grupo heterogéneo caracterizado por un inicio temprano de la enfermedad, y típicamente refractarios a las convulsiones de tratamiento con una mayor tasa de mortalidad ¹⁹⁰. Existe un grado significativo de comorbilidad asociada a las EIEE

que incluye retraso global del desarrollo, trastornos del movimiento, autismo y problemas de conducta ¹⁹¹.

La causa de la encefalopatía en EIEE es a menudo genética, la mayoría son causadas por variantes dominantes *de novo*, aunque las formas recesivas autosómicas y ligadas al cromosoma X también pueden ser identificadas (por ejemplo, *ARX* y *CDKL5*) ^{192,193}.

1.6.1.2.2. Morfogénesis cerebral

Las malformaciones en la morfogénesis cerebral representan una causa importante de discapacidades del desarrollo. Los genes que se han asociado a estas patologías suelen estar involucrados principalmente en la proliferación y especificación celular, la migración neuronal y la organización cortical tardía ^{194,195}.

La heterotopia severa implica trastornos de migración neuronal difusos que causan un deterioro neurológico global grave. Las anomalías en los genes *LIS1* ¹⁹⁶, *DCX* ¹⁹⁷, *ARX* ¹⁹⁸, *RELN* ¹⁹⁹, *ACTB*, *ACTG1* ²⁰⁰, y *CDK5* ²⁰¹ se han asociado con estas malformaciones. Estudios más recientes también han establecido una relación entre la lisencefalia, con o sin microcefalia asociada, disgenesia del cuerpo calloso y la hipoplasia cerebelosa, y en ocasiones, un patrón morfológico consistente con polimicrogiria con variantes patogénicas en varios genes (*TUBA1A*, *TUBA8*, *TUBB*, *TUBB2B*, *TUBB3* y *DYNC1H1*), que regulan la síntesis y la función de componentes de los microtúbulos y centrosomas y, por lo tanto, se definen como tubulinopatías ^{202,203}.

Los defectos que afectan solamente a un conjunto de neuronas, como la heterotopia leve de la banda subcortical y la heterotopia periventricular, se han asociado con defectos en los genes *DCX*, *FLN1A* y *ARFGEF2* y causa un deterioro neurológico y cognitivo que varía de déficits leves a graves. La polimicrogiria es el resultado de una organización cortical tardía anormal y está asociada de manera inconstante con una migración neuronal anormal ²⁰².

1.6.1.2.3. Discapacidad Intelectual

La discapacidad intelectual (ID) es uno de los trastornos neurológicos más comunes y presenta una prevalencia variable según la edad: prevalencia de 3.3 / 1000 si el rango de edad es de 20 a 50 años, pero de 14.3 / 1000 si el rango de edad es de los 6 a los 15 años ²⁰⁴⁻²⁰⁶.

La Organización Mundial de la Salud define actualmente la discapacidad intelectual como "una capacidad significativamente reducida para comprender información nueva o compleja, para aprender y aplicar nuevas habilidades (inteligencia deteriorada)" ²⁰⁷. Otra definición, proporcionada por la Asociación Americana de Discapacidad Intelectual y del Desarrollo, la define como "una discapacidad caracterizada por limitaciones significativas tanto en el funcionamiento intelectual como en el comportamiento adaptativo, que incluye muchas habilidades sociales y prácticas cotidianas" ²⁰⁸.

Aunque la etiología de estas patologías puede ser muy heterogénea, las huellas genéticas subyacentes han sido desveladas en los últimos años. Los pacientes con ID, sindrómicos o no sindrómicos, suelen presentar defectos en genes asociados al cromosoma X, como el *CLCN4*, *CNKSR2*, *FRMPD4*, *KLHL15*, *LASIL*, *RLIM* y *USP27X*) ²⁰⁹. Estos genes fueron identificados de manera sencilla debido a que su patrón de herencia permite la transmisión directa a través mujeres/madres portadoras no afectadas, y pueden explicar el fenotipo clínico de pacientes masculinos con ID ²¹⁰. Por otra parte, se estima que variantes *de novo* son responsables de cerca de 50% de los casos severos de ID y que en poblaciones donde la consanguinidad es frecuente, la mayoría de los casos con ID son de herencia recesiva ²¹¹. Aun así, se estima que alrededor del 30-70% de los casos de discapacidad intelectual no tienen una etiología conocida ²¹².

El rápido avance de las tecnologías NGS, prometen aumentar la comprensión de la etiología de estas patologías mediante la identificación de genes y mecanismos que contribuyen a su desarrollo.

1.6.1.2.4. Trastornos Neuromusculares

Los trastornos neuromusculares afectan al sistema nervioso periférico y a los músculos y pueden ser un grupo heterogéneo de afecciones genéticas, con herencia autosómica dominante, recesiva o ligada al cromosoma X. También pueden resultar de variantes patogénicas en el ADN mitocondrial o *de novo*. La alta incidencia de las variantes *de novo* ha sido descrita con el aumento de información sobre la genética de los trastornos neuromusculares. Se caracterizan por una degeneración muscular progresiva y debilidad debido a defectos en genes que la función del músculo esquelético. El inicio puede ocurrir en la infancia y tener una progresión severa o puede aparecer más tarde con una progresión más lenta ²¹³.

Como ejemplo de este tipo de patologías tenemos la enfermedad de Duchenne, una distrofia muscular asociada a defectos en el gen DMD, asociado al cromosoma X ²¹⁴. Las distrofias musculares de la cintura escapular (LGMD), son un grupo de trastornos que afectan principalmente a las cintura pélvicas y escapulares. Estas patologías pueden presentar una herencia autosómica recesiva y, con menos frecuencia, autosómica dominante. Actualmente hay 19 genes recesivos (LGMD2A-2T) y ocho genes dominantes (LGMD1A-1H) identificados. Los pacientes afectados pueden tener una progresión leve de la enfermedad leve o tener un fenotipo grave, clínicamente muy similar a la distrofia muscular de Duchenne ²¹⁵.

La paraparesia espástica hereditaria se define como un grupo de trastornos hereditarios raros que causan debilidad y rigidez en los músculos de los miembros. Los síntomas suelen empeorar gradualmente con el tiempo. Se han identificado genes de herencia dominante, responsables por el 75%-80% de las personas afectadas (*SPAST*, *ATL1*, *REEPI*). La paraparesia espástica autosómica recesiva se estima que esté presente en 25%-30% de los pacientes

con variantes patogénicas identificadas en varios genes como *CYP7B1*, *SPG7*, *SPG11* ²¹⁶.

Las enfermedades de neuronas motoras son un grupo de trastornos neurodegenerativos donde están afectadas las neuronas motoras superiores y/o inferiores, como la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal, la parálisis bulbar progresiva y la esclerosis lateral primaria ²¹⁵.

1.6.1.2.5. Trastornos del Movimiento

Los trastornos genéticos del sistema nervioso central pueden causar trastornos del movimiento o ataxia, como parte del fenotipo clínico. Los trastornos del movimiento en niños están asociados a defectos en el desarrollo neurológico y con retraso global del desarrollo, disfunción cognitiva, trastornos del comportamiento y / o epilepsia. Se pueden clasificar en 2 categorías ²¹⁷.

1. Los movimientos hipercinéticos, definidos como movimientos no voluntarios y excesivos, incluyen distonía, corea, atetosis, mioclonia, temblor, y estereotipias ²¹⁸.

2. Los movimientos hipocinéticos, descritos como una disminución en el número de movimientos, que se denominan como síndrome hipocinético rígido o parkinsonismo ²¹⁹.

La distonía es una característica de muchos trastornos hereditarios neurodegenerativos y metabólicos y puede estar asociada a otros signos tales como afectación cognitiva, signos piramidales o anomalías oculares. Variantes en el gen *DYT1*, que codifica la proteína torsina A, son responsables de la forma más común de distonía primaria, heredada como un rasgo autosómico dominante ²²⁰

Las discinesias paroxísticas causan un trastorno de movimiento mixto con elementos de distonía, corea y balismo. La discinesia paroxística cinesigénica, asociada a defectos en el gen *PRRT2*, se

caracteriza por ataques de corta duración, que generalmente duran solo unos segundos, pero ocurren hasta 100 veces por día. Los ataques generalmente son precipitados por movimientos repentinos o la anticipación del movimiento ²²¹.

Frecuentemente las ataxias de inicio temprano tienden a ser autosómicas recesivas, pero las de inicio tardío suelen ser autosómicas dominantes y la herencia ligada al cromosoma X es muy rara. Las ataxias dominantes son un grupo clínico y genéticamente complejo de trastornos neurodegenerativos que se caracterizan por una ataxia cerebelosa progresiva y se asocia de manera variable con otras características neurológicas extracerebelosas como la oftalmoplejía, la atrofia óptica, la neuropatía periférica y los signos piramidales y extrapiramidales ²²².

1.6.1.2.6. Ciliopatias

Las ciliopatias son un grupo de trastornos hereditarios causados por defectos en el funcionamiento de los cilios. Los cilios son orgánulos celulares que sobresalen de la membrana plasmática apical y tienen un papel importante en la transducción de señales, facilitando las comunicaciones entre las células y su entorno. La alteración ciliar puede dar lugar a una amplia variedad de trastornos clínicos y genéticamente heterogéneos con fenotipos superpuestos, como por ejemplo, el síndrome de Joubert y el síndrome de Meckel-Gruber que son trastornos del desarrollo neurológico raros que se superponen genética y fenotípicamente ²²³.

Las características comunes son enfermedad quística renal, ceguera, defectos del tubo neural, discapacidad intelectual, anomalías esqueléticas que van desde polidactilia a costillas y extremidades anormalmente cortas, defectos ectodérmicos, obesidad, situs inversus, infertilidad y anomalías respiratorias ²²³.

1.7. IMPLICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

La genética médica aplicada a las enfermedades raras se ha incorporado en la práctica clínica con la aplicación de las tecnologías de secuenciación masiva que impulsaron los descubrimientos iniciales de investigación en estas patologías. La NGS ha facilitado la detección no sólo de nuevos genes pero también nuevas asociaciones genotipo-fenotipo para genes previamente implicados en afecciones mendelianas, ya sea estableciendo relaciones causales con diferentes patologías conocidas o nuevas, o expandiendo el espectro clínico de enfermedades mendelianas ya establecidas ²²⁴. Así, estos avances están permitiendo aumentar cada vez más la capacidad del diagnóstico genético de estas patologías.

El poder del diagnóstico genético es especialmente claro para aquellos pacientes que presentan enfermedades monogénicas. La secuenciación en trío de padres-paciente puede detectar variantes *de novo* en los trastornos dominantes y variantes raras bialélicas en enfermedades recesivas. La transición de las pruebas genéticas dirigidas, como los paneles genéticos o exoma clínico, a la secuenciación del genoma puede permitir la reanálisis de casos que no obtuvieron un resultado diagnóstico molecular, incluida la reinterpretación de secuencias individuales sobre la base de investigaciones posteriores. Sin embargo, las tecnologías NGS aún presentan limitaciones y se requieren diagnósticos moleculares mejorados para garantizar la detección confiable de un subconjunto de trastornos genéticos, incluidos los que surgen de repeticiones triples y reordenamientos complejos. La secuenciación de los tejidos afectados para las variantes en mosaico y el uso de la secuenciación de ARN para detectar variantes no codificantes que impulsan la enfermedad de inicio temprano (por ejemplo, a través de los efectos en el empalme) representan nuevos desafíos para el diagnóstico clínico. En última instancia, las barreras a la medicina genómica se superan más directamente al demostrar la utilidad clínica en el manejo de la enfermedad y la toma de decisiones terapéuticas, con

evidencia de mejores resultados para los pacientes y en un adecuado asesoramiento genético para la familia.

La NGS tiene así un poder sin precedentes para transformar la práctica clínica de diagnóstico de enfermedades genéticas neurometabólicas raras con beneficios importantes para los pacientes. Para las enfermedades con tratamiento disponible, el diagnóstico en la etapa presintomática es crítico, un valor reconocido desde hace mucho tiempo con la inclusión de muchos ECM en los programas de detección de recién nacidos. Sin embargo, para que los avances de la investigación de NGS se traduzcan de manera eficiente a la clínica o al hospital, se deben cumplir requisitos previos mínimos, como una infraestructura óptima para producir y manejar datos complejos a gran escala combinados con expertos capaces de datos genómicos regulados y seguros gestión e interpretación de datos precisa y de alta calidad en estrecha colaboración con médicos.





2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- a) Evaluar la utilidad diagnóstica de los paneles génicos en el diagnóstico molecular de las enfermedades metabólicas hereditarias y neurológicas.
- b) Evaluar la utilidad diagnóstica del NeuroExoma, un exoma clínico dirigido específicamente a este grupo de enfermedades

2.1.1 Objetivos secundarios

- a) Identificar los factores principales asociados a la variabilidad en el rendimiento diagnóstico de los estudios genéticos.
- b) Implementar el uso de los paneles génicos en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias en edad pediátrica.
- c) Aumentar el conocimiento de las bases moleculares de este grupo de enfermedades.

2.2. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Cuando la patología en concreto presenta alta heterogeneidad clínica o no hay hallazgos bioquímicos suficientes que orienten hacia un diagnóstico específico, pero hay una sospecha clínica firme de enfermedad metabólica hereditaria o de base neurológica, esta se puede abordar con secuenciación masiva utilizando paneles

genéticos diseñados específicamente para un grupo de enfermedades (Anexos).

Una vez alcanzado el diagnóstico genético del paciente, se pueden adoptar varias medidas preventivas:

- Realizar el análisis genético de las variantes encontradas en el paciente en la familia (análisis de portadores)
- Realizar asesoramiento genético familiar
- Diagnóstico prenatal en caso de nuevos embarazos





3. MATERIAL AND METHODS

3.1. STUDY DESIGN

Prospective study over a 4-year period of patients from Spain and Portugal with suspected hereditary neurological and / or metabolic genetic disease.

3.2. PATIENTS

Over a period of 4 years (September 2015 – November 2019), 825 paediatric patients were included in the study. All the 825 cases were from clinical centers from Spain and Portugal and they all had a diagnosis suspicion of metabolic or neurologic genetic disorders.

In all cases, prior to the genetic analysis, informed consent was obtained from the patient's legal guardians to carry out the genetic study. The relevant clinical information from the medical record was collected for the interpretation of the genetic results. For its execution, this project was submitted for approval by the Autonomous Committee of Ethics of Clinical Research of Galicia (code 2015/410). This study respects the fundamental principles established in the Declaration of Helsinki of the World Medical Association, in the Convention of the Council of Europe related to human rights and biomedicine and fulfills the requirements established in Spanish legislation in the field of biomedical research, the protection of personal data and bioethics.

3.3. GENE PANELS DESIGN

The gene panels were designed using the OMIM databases (<https://omim.org/>) as the main source of information, as well as periodic reviews of the scientific literature. In this way, the relevant genes previously associated with 10 groups of diseases were selected, and clustered together generating 10 disease-panels (Table

3). The review and update of the gene panels were carried out periodically throughout this work. The 10 individual panels were then grouped into a clinical directed exome, called NeuroExome.

Gene Panel	Number of genes
<i>Hypoglycemia and Hyperglycemia</i>	72
<i>Intermediate metabolism defects</i>	156
<i>Mitochondrial diseases</i>	268
<i>Complex Molecule Metabolism and Leukodystrophy</i>	176
<i>Epilepsy</i>	259
<i>Cerebral Morphogenesis defects</i>	195
<i>Intellectual disability</i>	180
<i>Neuromuscular disorders</i>	323
<i>Movement disorders defects</i>	313
<i>Ciliopathies</i>	81
<i>NeuroExome</i>	1929

TABLE 3 - TOTAL NUMBER OF GENES INCLUDED IN EACH OF THE DESIGNED GENE PANELS.

3.3.1. Genetic panels technical features

All the gene panels had an average coverage achieved between 200-300X. The mean percentage of bases with coverage <10X per sample analyzed is 0.28% (28 out of 10,000 bp are found with coverage <10X or insufficient). These coverage defects are caused by intrinsic problems to the enrichment method used. However, this calculation is made for readings of quality greater than 20 (Q20 - Qscore, estimates the probability of an error in the identification of a nucleotide base based on a quality model, Phred quality score). For a Q20, the probability of base error factor is 1 in 100, which implies greater reliability of bases with insufficient coverage.

3.4. NGS SEQUENCING

The genetic study is carried out with the creation of a working pipeline that combines sequencing and bioinformatic analysis methods for the identification and annotation of variants with relevant biological significance (Figure 4).

In this section it is described the process of sequencing different regions of the human genome for DNA samples, using Illumina's sequencing technology (www.illumina.com). The regions to be sequenced were defined and designed in-house and provided by Agilent.



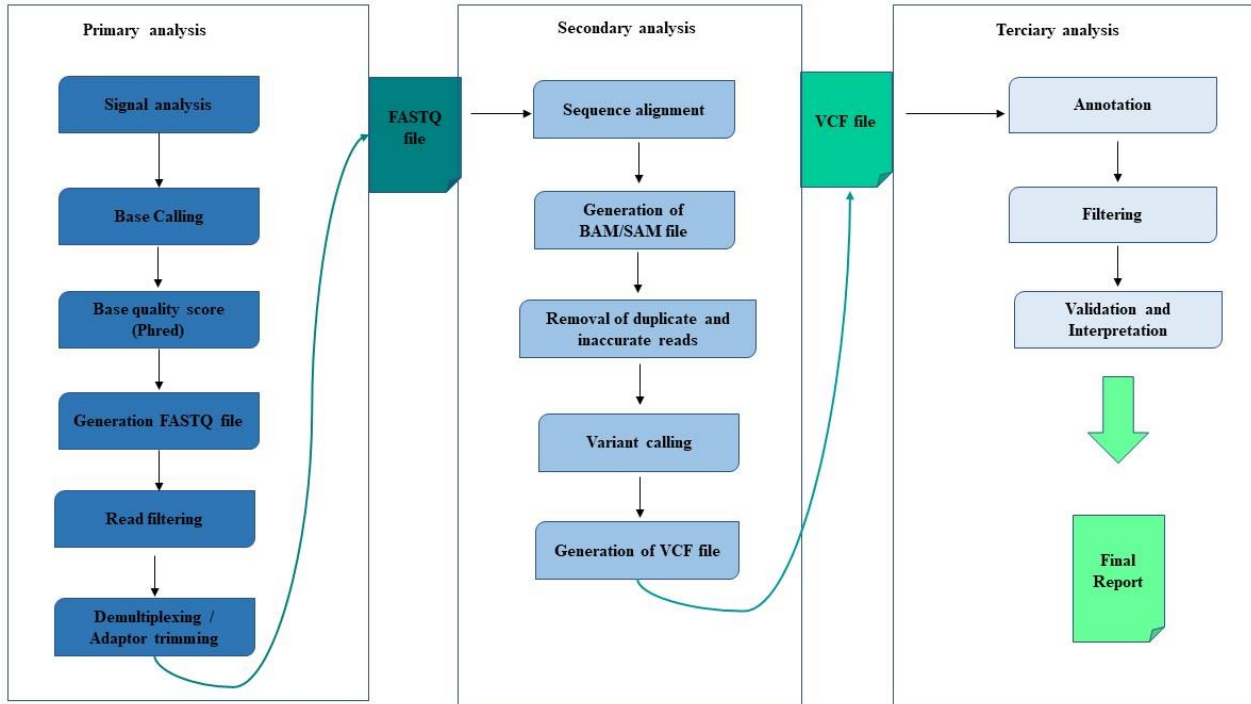


FIGURE 4 - AN OVERVIEW OF THE NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) BIOINFORMATICS WORKFLOW.

Illumina's sequencing technology is based on the clonal amplification of individual DNA molecules. In this Synthesis Sequencing process, fluorescently labeled nucleotides with reversible termination are used. The reliability of nucleotide incorporation is very high, since in each sequencing cycle there is a competition between the 4 bases. For each library (sequencing line), several million sequenced fragments (reads) are obtained, which can guarantee a high coverage in each region and strengthening the quality of the consensus sequences generated. Each sequencing run allows the analysis of one flow cell (physical support of the samples in the sequencing process). For sequence capture it was used the Agilent Technologies SureSelect Solution Hybridization System (compatible with Illumina sequencing protocols). The probes of the sequence regions of interest were designed for each gene panel. These probes included exons and intron-exon boundaries of a pre-selected group of genes, including all the transcripts for each one of them. The Sure Design web-based probe design tool was the one used for this purpose (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>). To guarantee an optimal representation of all regions of interest, different subgroups of probes were designed according to the percentage content of GC and the presence of repetitive sequences.

The sequencing protocol was performed following the approved protocols and using the equipment and reagents officially recommended by Illumina.

3.4.1. Samples reception and DNA extraction

Patient's blood sample were received in an anticoagulated tube with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), at Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Hospital Clínico de Santiago de Compostela along with a requisition form specifying the gene panel requested and a brief summary of patient's clinical history, including family background. Genomic DNA was then extracted using the commercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), following the manufacturer's instructions. The concentration of the DNA obtained was quantified using the NanoDrop 1000

Spectrophotometer (Nanodrop Technologies) and the Qubit® fluorimeter. Furthermore, DNA integrity was checked by 0.8% agarose gel electrophoresis. In all cases, at least 3µg of complete DNA was obtained, free of impurities ($A_{260} / A_{280} > 1.8$ and $A_{260} / A_{230} > 1.5$).

3.4.2. DNA Libraries with Sequence Capture

Once the genomic DNA samples from the patients have been checked, the libraries to be sequenced were prepared. The SureSelect (Agilent) kits used were: SureSelectXT Reagent kit, HSQ and SureSelect Capture Library Custom 0.5-2.9 Mb (16 reactions). The kit TrueSeq DNA Sample Preparation (Illumina) was used for the NeuroExome panel analysis. It is called library to the pool of samples that were sequenced together. An excel document was prepared which specifies the samples that were included in each of the libraries, as well as the capture library used for each sample. For the preparation of the libraries, the protocol indicated by Agilent, SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library (Version 1.5, November 2012), was followed, using the additional recommended material.

The genomic DNA was fragmented by sonication, using an isothermal mechanical process by Covaris (Covaris, Inc) for fragments enrichment of 150-200 bp range. For quality control samples were checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer system, an established automated electrophoresis solution for the sample quality control of biomolecules. Samples showing insufficient fragmentation were sonicated again under the same conditions but for shorter times (between 10 and 25 minutes depending on the electropherogram obtained by the Bioanalyzer).

The quality control of the fragmented sample was performed by Agencourt AMPure XP beads, a process based on magnetic sphere technology, it is an automated PCR purification system that offers quality DNA assessment.

The quality control of the samples was performed again by the Agilent 2100 Bioanalyzer, and next the ends of the generated fragments were repaired by a T4 DNA polymerase, Klenow, T4 PNK. Purification of the repaired DNA was checked again by Agencourt AMPure XP beads. The purification step was repeated between several protocol steps to guarantee DNA quality throughout the sequencing process.

After the DNA fragment's ends being repaired and the purification process completed, it was added dATP to the 3' ends of the DNA fragments. It was then performed the ligation of the specific adapters to the fragments of the Illumina sequencing platform and afterwards, hybridization of the libraries with a capture solution (to capture oligonucleotides) was performed, according to the Agilent SureSelect protocol. From each sample was used 750 ng in 3,4ul, but since the samples were more diluted in this step it was needed to measure the proper volume for the amount of 750ng, evaporation of the sample was performed on a Speedvac to subsequently bring the samples to 34ul. The hybridization time was around 20-23 hours and the recovery of the captured regions was performed by using the Dynal MyOne Streptavidin T1 magnetic beads.

A PCR of 14 cycles was applied to the captured library with Herculase II Fusion DNA Polymerase. The indexes that will identify each sample within the pool were included in this amplification step.

3.4.3. Sample dilution, pool, and preparation of libraries for sequencing

The samples were diluted to 10 nM and pools were prepared including 5µl of each sample. These sample pools are the libraries and each one was sequenced in a MiSeq flow cell.

The libraries were denatured with NaOH and then diluted for subsequent incorporation into the flow cell.

3.4.4. Sequencing in MiSeq platform (Illumina)

In the MiSeq platform, the sequencing process is performed and completed. It was first generated millions of clusters of DNA sequences (representative of the DNA fragments that make up each library) on the surface of the flow cell. Then the DNA clusters worked as sequencing amplicons and in each cycle, there was the incorporation of one nucleotide and the incorporated base is then registered. The reagents corresponding to the Illumina MiSeq® Reagent Kit v2 (300 cycles) were used. A sequencing run of 75 cycles of “paired end” was performed, with 6 cycles for the sequencing of each index.

3.5. BIOINFORMATIC ANALYSIS

The massive sequencing results obtained from the samples processed with the MiSeq are analyzed.

The main goal of this analysis is to read the 75 base fragments of the readings generated by the sequencer and align them against the reference human genome sequence, version 'hg19'. Subsequently, the data will be processed to detect possible genetic variants in the defined capture regions. To achieve this, computational analysis followed these steps.

a) Image analysis and transformation of fluorescence intensities in sequences (“Base calling”); Elimination of Illumina sequencing adapters, demultiplexing of samples, generation of .FASTQ files using Illumina algorithms. This step is carried out by the Real Time Analysis (RTA) software, incorporated in the MiSeq platform.

b) Quality control of the data obtained with the FastQC program.

c) Alignment of the sequenced fragments against the reference sequence with the BWA software.

d) Detection of gene variants and annotation, using Samtools and Annovar, as well as Progenika's own annotation programs.

3.5.1. Primary analysis

3.5.1.1. Image analysis and Base Calling

The Real Time Analysis (RTA) v.1.8.70 (Illumina) program performs the first steps of sequencing analysis, which is commonly called primary analysis. In each sequencing cycle, the sequencer produces a photo for each of the tiles or areas that make up the flow cell, and in each of these areas, photos were taken with the 4 specific fluorophore filters for each nucleotide.

From these files, RTA locates the generated clusters and extracts their intensities, their coordinates, and an estimation of the background noise for each cluster. The result of the image analysis is the input data for the allocation of the bases. RTA allows to transform the intensity signals into DNA sequence.

Depending on the efficiency of the reagent flows and sequencing reactions, a small number of molecules can be incorporated to fast (advanced) or delayed in their incorporation cycle, which is known as prephasing and phasing steps. This effect can be corrected during the base allocation step. As the statistical estimation for the correction step is based on the standardization of numerous clusters to evaluate the correlation of the signal in different cycles, this is more reliable for tiles with a large number of clusters and a mixture of different sequences. Samples with only a "small" number of different sequences do not produce such reliable estimates. When sequencing a 0.5-1.5 Mb region (depending on the capture library used), the number of different sequences may be less than a whole genome sequencing experiment, so this correction is important.

The result is a text file in "FASTQ" format which contains the sequence of each of the sequenced fragments and information about their quality.

3.5.1.2. Quality control

To confirm the quality of the generated data, the FastQC v0.10.1 program (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>) was used. This program allows to check about the composition and quality of sequencing. The quality of the sequencing data is measured using the Phred Score measure, routinely employed in the Sanger sequencing methodology, and indicates the reliability of the assigned base in the sequencing process. Quality data is generally encoded in ASCII format and is found in the original Illumina files in .FASTQ format.

3.5.2. Secondary analysis

3.5.2.1. Genome assembly

The alignment was performed with the BWA 0.7.5a program⁸³ with the default parameters. In order to detect possible contamination problems and alignment with similar sequence regions in other sections of the genome (segmental duplications, etc.), the generated fragments are aligned against the entire human genome (version hg19). In this way we can select those fragments that align in a single genomic position and in the area of interest. The areas of interest comprise the captured regions specified by previously.

From the alignment data and the capture genomic coordinates (data included in the target.bed file of the experimental design), the NGSrich program (<http://ngsrich.sourceforge.net>) was used to evaluate the capture efficiency.

Since no filtering was performed based on the coverage obtained, there is a risk of false positives and / or false negatives in regions covered with less than 20X. For each sample, a file was generated, called “GRXXX_lowCoveragePositions.txt” (where XXX corresponds to the specific number of each sample), which

includes those regions with less than 20X coverage in each of the samples analyzed. In these regions the probability of not detecting any variant is much higher than in the remaining.

After alignment, those fragments that have aligned with a quality less than a Phred value of 20 units are eliminated, which would correspond to an alignment error probability of one base in 100. These high-quality alignment reads are those that are used for the variant detection step. This step reduces the number of false positives in the results.

The data filtered by alignment quality was saved in the files “GRXXX_covered_QCalign.bam” and “GRXXX_covered_QCalign.bam.bai”.

3.5.2.2. Variant calling

The process of variants detection of variants, such as substitutions and INDELs (small insertions-deletions), included in the capture regions was performed with Samtools 0.1.19 program⁸³ and the VarScan program²²⁵ programs commonly used in the literature for the detection of variants.

Based on the alignment data obtained, the variant detection programs establish the existence of a variant in a position by finding different bases in the sample than those observed in the reference sequence. The final assessment of a variant will be dependent on the number of reads that support the existence of that variant as well as the quality of the alignment and the call. In this case, for the detection of variants, the default parameters of Samtools were used except for the read alignment quality limit of 20 Phred units. Assigning a variant requires enough reliability of the assigned base from the fragments that align in that position. This reliability was mainly determined by 2 factors: on the one hand, the QUAL value that informs us about the Phred quality for the proposed alternative base and, on the other hand, the DP4 value that reports the number of high quality fragments in the detected base as a variant both in the forward and reverse sequences. In general, to consider an accurate detection of the variant, it is recommended to get a value of QUAL (Phred quality of the proposed

alternative base) greater than or equal to 20. Likewise, to assign a variant, it is recommended that the number of total reads found in that position is enough for acceptable coverage reliability.

For each sample, a vcf file was generated with all the variants found, called “GRXXX.vcf” for each sample, which was saved in the Results folder. In addition, an Excel file called “GRXXX.xlsx” was prepared and in each there are two sheets, one for SNPs and other for INDELS. In each excel file the results are shown as follows:

- CHROM: Chromosome in which the variant is found.
- POS: Chromosomal position in which the variant is found.
- REF: Base on the reference sequence.
- ALT: Alternative base in the sample after alignment.
- QUAL: Quality Phred value for the proposed base in ALT. The higher the value, the more reliable is the base established in ALT.
- DP: Total raw coverage.
- DP4: Number of reads that align with the reference base in forward direction (ref F), in reverse direction (ref R) and number of reads that align with the alternative base in forward direction (alt F) and in reverse direction (alt R).
- MQ: root mean square of the alignment quality of the reads that cover the region.
- GT: Genotype type, 0 for the reference allele and 1 for the alternative allele.
- GQ: Quality of the genotype given in the GT column, on Phred scale.

In the INDELS sheet, there is also an additional column:

- IS: maximum number of reads that support an INDEL, and the fraction of the total reads.

3.5.3. Terciary analysis

3.5.3.1. Identification and annotation of the identified variants

The set of the variants obtained previously were annotated by using the Annovar program⁹⁶ and VarScan program²²⁵ for the annotation against dbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism database*) and RefSeq (*Reference Sequence collection*). In addition, the results were annotated against the database of the 1000 Genomes project⁵¹, ESP database⁹⁷ and GnomAD⁶⁵. In this case, for the general population the 2012_04 database version was used, while for the European population, the phase 1_release3 version was used. A VCF file was generated containing meta information in lines, a header line, followed by the data, each of which contains information on the chromosome position, the reference base, the identified alternative base or bases. The results were shown as followed:

- Variant ID: Code that identifies the variant in the dbSNP 137 SNP database.
- Region and Gene: Indicates whether the variant affects exons, introns, intergenic regions, or areas of non-coding RNA. If the area is an exon, intron or non-coding region, Annovar indicates in the second column the name of the affected gene or genes. Conversely, if the variant does not affect any of these regions, Annovar indicates the names of the two neighboring genes along with the distance of those genes. This parameter is used when a variant fits multiple categories. The value in the first column took the following order of preference: exonic = splicing> ncRNA> UTR5 / UTR3> intron> upstream / downstream> intergenic. When a variant was classified as exonic it refers only to the coding portion, but not to the UTR region. Splicing was defined as a variant that is 1 or 2 base pairs from an exon / intron boundary. If a variant was located in both 5'UTR and 3'UTR region, the result was shown as "UTR5, UTR3", respectively. The terms "upstream / downstream" are defined as a distance of 1kb from the transcription start or end site. If a variant was located both upstream and

downstream (due to the existence of two different genes) then “upstream / downstream” will appear in the first column.

- **Consequence:** Identifies the changes presented as a consequence of the exonic variants. Only exonic variants were annotated so the remaining variants do not have this information included in this column. Possible values for this field include: nonsynonymous SNV, synonymous SNV, frameshift insertion, frameshift deletion, nonframeshift insertion, nonframeshift deletion, frameshift block substitution, nonframeshift block substitution.

- **Additional information:** additional information about the variant.

- **MAF_1000g_ALL:** frequency of the minor allele in the general database of the 1000 Genomes project

- **MAF_1000g_EUR:** frequency of the allele

3.5.3.2. Variant filtering and prioritization

The prioritization of the variants identified in the steps described above, and their classification as pathogenic (P), likely pathogenic (LP), variant of uncertain significance (VUS), likely benign (LB) or benign (B), was made based on the criteria of the American College of Medical Genetics (ACMG) ⁹⁹ and their registration at the database ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

The frequency of the variants has been confirmed in population databases such as 1000Genomes, ExAC, gnomAD and in our in-house database created with the storage and registration of the variants identified in our population. Variants were discarded if they presented a $MAF > 0.01$.

The position of the identified variant has been evaluated according to different criteria:

a) If it is in an exonic region: assess the possible functional consequence of the variant in the following pathogenicity order:

1. Variants that delete or duplicate one or more exons of a gene, or even the complete gene (CNV).

2. Truncated variants: small deletions or insertions that change the reading pattern (frameshift), or variants that cause the change of an amino acid to a stop codon (stop).

3. Small deletions or inserts that do not change the reading pattern (nonframeshift).

4. Variants that change the amino acid (missense). To predict the effect of non-synonymous coding variants, the tool CONsensus DELeteriousness (CONDEL) ⁹⁴ was used where missense variants were classified as Deleterious (D) or Neutral (N) according to the functional impact that they could have in protein.

5. Variants that do not change the amino acid or synonyms but that could influence the splicing and mRNA splicing.

b) If the variant is located in an intronic region: the position with respect to the consensus sequences of splicing was assessed.

The impact of intronic or synonymous variants on RNA splicing was evaluated using the Human Splicing Finder (HSF) software ²²⁶. In this tool, the effect of the variants in the splice sites could be predicted including the 5' donor splicing site (AG dinucleotide immediately before the exon), the 3' splicing site or acceptor site (GT dinucleotide immediately after the exon), the branch point (located at 18-40 nucleotides upstream of the acceptor site and other regulatory sequences along the pre-mRNA such as: exonic sequences that stimulate splicing (ESE – Exonic Splicing Enhancer) and exonic sequences that repress splicing (ESS - Exonic Splicing Silencer).

The degree of pathogenicity of each variant was analyzed through the DANN tools ²²⁷ (the range of values is from 0 to 1, with 1 being attributed to the variants that are predicted to be more harmful) and Mutation Taster ²²⁸ which predicts the disease potential by a Bayes classifier algorithm.

To calculate the degree of conservation of a nucleotide base against a possibly pathogenic variant, the GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling) tool was used, which predicts conservation by quantifying substitution deficits in multiple orthologous alignments using the genomes of 35 mammals. Its range is -12.3 to 6.17, with 6.17 being the most conserved²²⁹.

3.5.3.3. Variant report

In this study, a positive diagnosis was considered in the cases where:

- a) A *de novo* variant (P or LP) in a dominant gene whose associated phenotype matches with that of the patient.
- b) Two trans variants (P or LP) in a recessive gene whose associated phenotype matches with that of the patient.
- c) Hemizygous variants classified as pathogenic.

An inconclusive diagnosis was considered when:

- a) A VUS in a dominant or two VUS in a recessive gene whose associated phenotype matches with that of the patient.
- b) When the non-completion of tests in relatives did not allowed to accept or reject the hypothesis of positive association with the pathology.
- c) When the available clinical information of the patient was not enough to stablish a direct link between genotype and phenotype.
- d) When expression studies were pending to confirm or rule out the pathogenicity of a variant.
- e) When the variants were found in dominant genes, but these were also found in unaffected individuals. There could be the probability of incomplete penetrance of the variant and that it depended on the concurrence of other variants in related genes, or there is the probability of mosaicism in the parent from whom the variant has inherited, which would explain the lack of phenotypic expression in it, however, it was not possible to demonstrate during this work.

- d) When a variant (P or LP) is identified in a recessive gene whose associated phenotype matches with that of the patient, but a second variant was not detected.

3.6. CARRIER STUDY – SANGER SEQUENCING

If one or more variants identified by NGS could be involved in the clinical phenotype of the case under study, a family study of this variant was recommended to determine its segregation. This family study consisted of analyzing by classical sequencing the presence or absence of the variants in the patient's immediate relatives. In general, the family study was focused on parents and siblings.

3.6.1. Primer design for amplification

Primers needed to amplify the DNA fragment containing the variant to be studied were designed using the Primer3 Input program (version 0.4.0). Once designed and validated under the appropriate conditions, these were ordered and synthesized by Sigma-Aldrich.

3.6.2. Polymerase Chain Reaction - PCR

Genomic DNA from the patients and their relatives were amplified through PCR for classical sequencing. Both samples were sequenced at the same time by ABI PRISM capillary sequencer. DNA sequences were read through CHROMAS v2.6.5 software, an editor for chromatograms (traces) from automated Sanger sequencers²³⁰.

3.7. FUNCTIONAL STUDIES

During the doctoral period, an international stay of three months was carried out at the Radboud Center for Mitochondrial Medicine belonging to the Department of Pediatrics Radboud University Medical Center, (Netherlands). Functional studies, described below, have been

performed to confirm the pathogenicity of genetic variants identified in three cases (43, 163, 362) with suspected mitochondrial disease.

3.7.1. Cell culture

Fibroblasts from all patients and control samples were grown in M199 culture medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin / streptomycin, with a final concentration of 100U 100ugr/ml (Gibco) in T25 culture plates. (25cm²), T80 (80cm²) and T175 (175cm²). Cell cultures were maintained at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂.

3.7.2. Mitochondrial isolation

A total of $5,5 \times 10^6$ fibroblasts from both patients and controls were resuspended in 1250 µl of 10 mM Tris-HCl, pH=7,6 and lysed in a Potter-Elvehjem homogenizer at 1800 rpm. Afterwards, 250µl 1,5 M Sucrose was added in order to balance the osmolarity. Cell lysates were centrifuged for 10 minutes at 600 x g. The supernatant was recovered and centrifuged for 10 minutes at 14000 x g obtaining the mitochondrial pellet.

3.7.3. Measurement of mitochondrial respiration and OXPHOS complexes activity

Mitochondrial respiration and glycolytic flux were determined in fibroblasts from both patients and controls. The oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rates (ECAR) were recorded in a SeaHorse FX-96 analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) following the protocol of the Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress test kit.

On the day prior to measurement of mitochondrial respiration, patients and control fibroblasts were collected from the cell cultures and

a cell suspension was prepared in 20% FCS medium. Then, the cells were transferred into a 96 wells plate (XF Cell Culture Microplate) at a final concentration of 10,000 cells/well and incubated overnight, at 37 ° C in a 5% CO₂ atmosphere. On the day of the assay, the were washed and incubated in assay medium (Seahorse XP, cat. No. 102353-100). Afterwards, the basal fluxes were recorded followed by the addition of: 1 μM of Oligomycin which inhibits ATP synthase (complex V), 2.0 μM + 4.0 μM carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone FCCP which uncouples oxygen consumption from ATP production, and 0.5 μM rotenone + 0.5 μM antimycin A to inhibit complexes I and III, respectively. Both OCR and ECAR baseline rates were measured repeatedly before adding the previously described compounds. The OCR are reported in pmol / min and the ECAR in mpH / min. All data were normalized to citrate synthase (CS) activity.

The enzymatic activities of complexes I-IV, and citrate synthase were analyzed spectrophotometrically in the fibroblasts of the patients and controls. The results of the activities of the respiratory chain complexes were normalized using the activity of citrate synthase which represents an assessment of mitochondrial amount and integrity for each sample ²³¹. All analyzes were performed in duplicate using the Konelab 20XT spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific).

3.7.4. SDS-PAGE and BN-PAGE immunoblot analysis

Mitochondrial fractions from the control and patient cell lines were used for the detection of FOXRED1 and EARS2 proteins, either using SDS-PAGE or for analysis of native mitochondrial complexes (in the case of FOXRED1), by BN-PAGE followed by immunoblotting. For SDS-PAGE, mitochondria were heat-denatured at 70 ° C in the presence of β-Mercaptoethanol and separated on a polyacrylamide gel with 10% sodium dodecyl sulfate. For BN-PAGE, the native mitochondrial complexes were solubilized with 2% n-dodecyl β-D-maltoside and separated in a gradient polyacrylamide gel. Subsequently, the proteins were transferred to a PVDF membrane (0.20

Immobilon-P, Millipore IPVH00010) and immunodetection was performed with the following antibodies to FOXRED1: polyclonal rabbit (Proteintech: 24595-1-AP); CI-NDUFa9 (ab14713, Abcam); CII-SDHA (Ab14715; Abcam); and for EARS2 polyclonal rabbit (Proteintech: 17539-1-AP). The secondary antibodies used were goat anti-mouse (P0047; DAKO) and goat anti-rabbit (A00160, Genscript). The chemiluminescence signal was visualized using the Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL, Thermo Fischer Scientific) and the Chemidoc XRS + System (Biorad, Hercules, CA).

3.7.5. Viral transfection and transduction: pLenti6.2 V5

For the three patients with suspected *FOXRED1* or *EARS2*-associated mitochondrial disease, viral transduction was performed with a lentivirus in order to rescue the expression of the gene that contains the molecular defect, and, consequently, to recover the function of the affected protein.

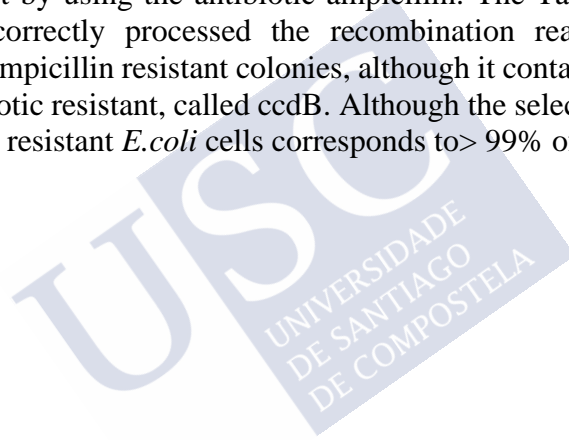
The specific vectors for *FOXRED1* and *EARS2* were designed and requested from Harvard plasmid. The plasmids have been designed in an "open" version in order to clone the cDNA in pLenti-V5, which creates an expression vector with the corresponding cDNA and the respective V5 marker.

Initially, a molecular biology method known as the Gateway cloning system was used (figure 5), which allows the transfer of DNA fragments between plasmids by recognition of specific sequences called "att", a reaction in which the enzyme "LR clonase" participates and which is so-called "LR reaction".

The LR reaction is a recombination reaction between the Entry Clone and the Target Vector, mediated by a prepared solution of recombinant proteins and the enzyme LR clonase. In this reaction, the DNA fragments of the Entry Clone are transferred into the Target Vector to create an Expression Clone. The regions marked L, R, B and P correspond respectively to the specific sequences explained above: attL, attR, attB and attP. They are recombination regions for the

bacteriophage lambda present in *Escherichia coli* that are specifically recognized by the recombinant proteins.

In the cloning reaction, the recombinant proteins cut the Entry Clone gene from the left to the right and link it into the Target Vector, creating an Expression Clone. The gene located in the Expression Clone is surrounded by the attB1 and attB2 regions, and its orientation remains the same throughout the subcloning process once attL1 reacts only with attR1, and attL2 reacts only with attR2. Once the aliquot from the recombination reaction is ready, it is introduced into the *E.coli*. The *E.coli* was kept in culture plates where the colonies selection was carried out by using the antibiotic ampicillin. The Target Vector that has not correctly processed the recombination reaction does not generate ampicillin resistant colonies, although it contains a lethal gene and antibiotic resistant, called ccdB. Although the selection process for ampicillin resistant *E.coli* cells corresponds to > 99% of the colonies.



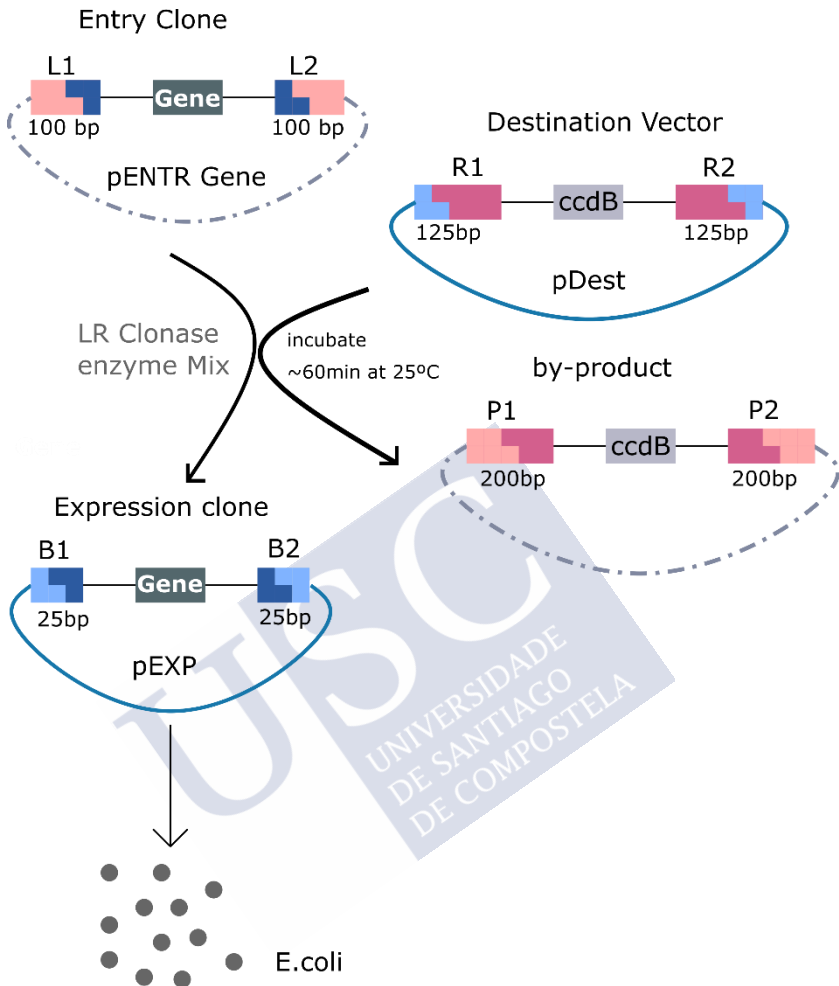


FIGURE 5 - *GATEWAY CLONING REACTIONS*: The LR Reaction is represented in this figure. An Entry Clone, containing the gene of interest, *FOXRED1* or *EARS2*, surrounded by the recombination regions, will recombine with the Destination Vector to produce an Expression Clone and a derived plasmid. As result of this reaction, the gene sequence of the Entry Clone is transferred to the Expression Vector donated by the Target Vector. The generated plasmid contains the *ccdB* gene, resistant to ampicillin.

3.7.5.1. Lentivirus transduction in primary fibroblasts for functional complementation

In this process, the fibroblasts of the study patients were transfected with pLentiFOXRED1 and pLentiEARS2.

The production of the lentivirus replication was initiated by co-transfecting a previously prepared DNA packaging solution and the expression plasmid Lenti into HEK293 cells. This packaging mixture consists of three packaging plasmids: PLP1, PLP2 and PLP / VSG. These provide the structural and replication proteins necessary for the production of the lentivirus. The viruses generated grew in the culture medium, 2% FCS / DMEM, and were collected 5 days after transfection. Once the virus was internalized into the cells, the viral RNA was reverse transcribed, actively imported into the nucleus, and then stably integrated into the host genome. The expression plasmid contains the DNA sequence of interest, which would be the gene that we intend to study, and also contains a specific gene that provides resistance to the blasticidin antibiotic, so that a subsequent selection is performed and a transduced cell line is created. Once the transduced cells were selected, they were stored at -80C for future research.

To confirm the presence of the virus in patients and control cell lines, the Lenti-X GoStix test was performed, where, if positive, it is expected to get more than 5×10^5 IUF / ml of lentivirus.

To guarantee a stable cell line from patient and control, and to make sure they are in good conditions, the number of passages is limited, and the fibroblasts were prepared in T25 cm² culture plates so that the confluence of the cell lines on the day of transduction was 70-80%.

On day 1 of transduction, 1ml of virus was added to each culture plates with the corresponding cell line. Some cell lines were incubated with the pLenti and GFP, which is a green fluorescent protein, a specific marker for the lentivirus detection in patient's and control fibroblasts.

Culture medium was changed on the following days and on day 3, 2 μ g/ml of blasticin was added to the culture plates to start the selection process of the cells with pLenti. Further progress in breeding the cell lines was achieved at the end of 6-8 weeks. During this period, cultures were refreshed every two days with fresh blasticin and medium culture and were transferred to a T80 cm² culture plates for functional tests.





4. RESULTADOS

Se estudiaron durante un período de 4 años a 825 pacientes <18 años, por sospecha de enfermedad metabólica y/o neurológica, provenientes de Hospitales de los Sistemas de Salud de España y Portugal. En total 346 (42%) mujeres y 479 (58%) varones, con edad media de 6,71 años (desviación estándar [DE] =5,73) y 7,18 (DE=5,55), respectivamente, analizados por distintos paneles genéticos (Tabla 4).

<i>Panel</i>	<i>Mujer</i>		<i>Varón</i>	
	<i>Edad</i>	<i>DE</i>	<i>Varón</i>	<i>DE</i>
<i>Hipo e Hiperglucemia</i>	6,04	7,51	8,60	5,29
<i>Metabolismo Intermediario</i>	2,00	1,32	2,40	3,02
<i>Enfermedades Mitocondriales</i>	6,68	5,57	6,19	5,40
<i>Defectos Moléculas Complejas y Leucodistrofias</i>	5,38	4,99	7,22	5,49
<i>Epilepsia</i>	6,94	5,52	6,98	5,78
<i>Defectos Morfogénesis Cerebral</i>	5,39	4,56	4,54	3,81
<i>Discapacidad Intelectual</i>	11,45	7,00	11,03	4,86
<i>Neuromuscular</i>	10,54	6,31	7,13	6,14
<i>Trastornos del Movimiento</i>	7,67	5,31	10,49	5,45
<i>Ciliopatías</i>	8,83	4,56	9,98	4,78
<i>NeuroExoma</i>	3,59	6,27	4,77	3,94
<i>Global</i>	6,71	5,73	7,18	5,55

TABLA 4 - EDAD MEDIA EN AÑOS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO GENÉTICO DISTRIBUIDOS POR PANELES.

Los paneles genéticos más solicitados fueron el de epilepsia (27%), mitocondrial (17%) y neuromuscular (10%) (Figura 6).

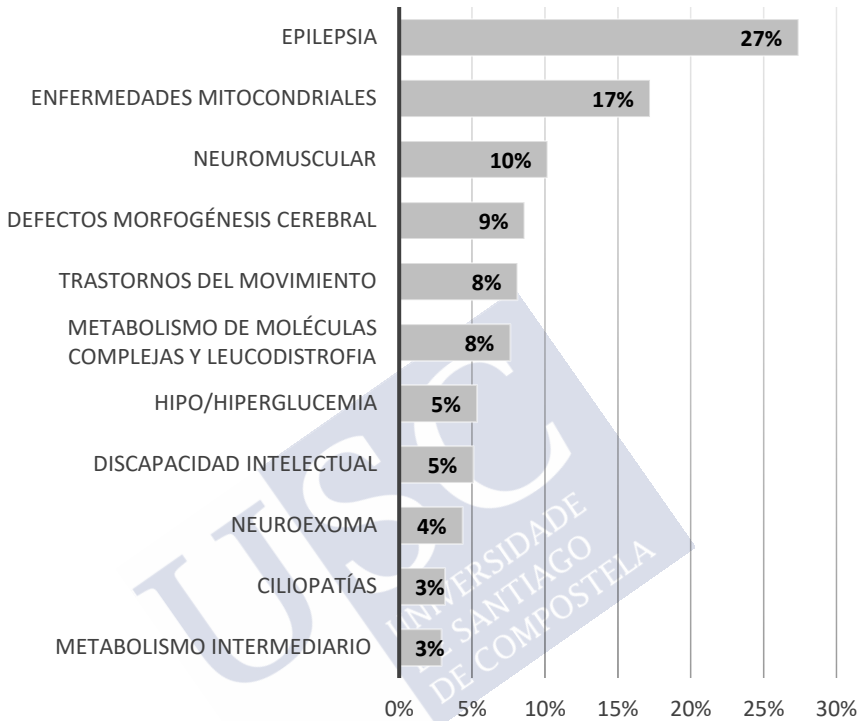


FIGURA 6 - PORCENTAJE DE ESTUDIOS REALIZADOS POR PANEL GENÉTICO.

Los paneles utilizados para el estudio fueron identificados mediante el diseño personalizado de las sondas respectivas (sondas ID). La profundidad de la cobertura media alcanzada ha estado entre 291-512X, correspondientes a los paneles de NeuroExoma y Defectos de la Morfogénesis Cerebral, respectivamente (Tabla 5).

<i>Panel</i>	<i>Media cobertura</i>	<i>% ≥20X</i>
<i>Metabolismo Glucosa</i>	413,81	99,93
<i>Metabolismo Intermediario</i>	360,71	99,17
<i>Enfermedades Mitocondriales</i>	334,05	98,79
<i>Defectos Moléculas Complejas y Leucodistrofias</i>	382,67	97,86
<i>Epilepsia</i>	404,51	97,79
<i>Defectos Morfogénesis Cerebral</i>	512,93	99,42
<i>Discapacidad Intelectual</i>	418,33	99,61
<i>Neuromuscular</i>	437,78	95,89
<i>Trastornos del Movimiento</i>	373,61	98,86
<i>Ciliopatías</i>	439,01	99,47
<i>NeuroExoma</i>	291,50	97,29

TABLA 5 - CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DE CADA PANEL GENÉTICO CON LA PROFUNDIDAD DE LA COBERTURA MEDIA EN CADA PANEL Y EL PORCENTAJE DE REGIONES CUBIERTAS $\geq 20X$.

Se obtuvieron los siguientes resultados mediante tecnología de secuenciación masiva con paneles génicos: 195 pacientes con diagnóstico positivo (24%), 179 casos con diagnóstico no concluyente (21%) y 451 casos con diagnóstico negativo (56%) (Figura 7).

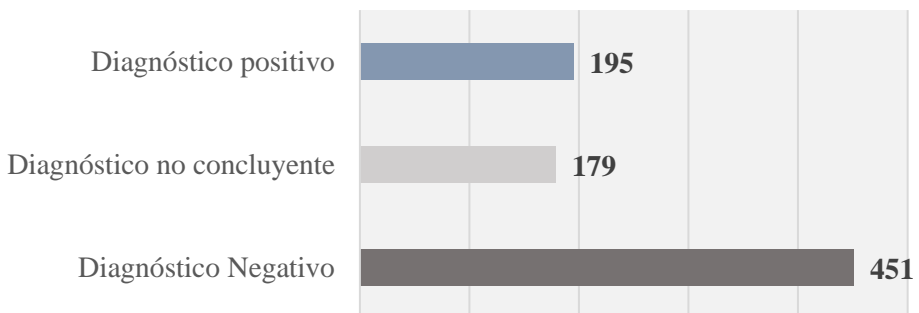


FIGURA 7 - TASAS DE DIAGNÓSTICO OBTENIDAS POR NÚMERO DE PACIENTES.

A continuación, se describen los resultados de diagnóstico por grupo de enfermedades y por panel analizado.

4.1. ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO (ECM)

En total se estudiaron 273 pacientes con sospecha de enfermedad metabólica hereditaria. En la tabla 6 se muestran el número (N) y porcentaje de casos diagnosticados según el panel analizado.

Panel	Diagnosticados		No Concluyentes		Negativos	
	N	%		%	N	%
Metabolismo Glucosa	8	18,60		20,93	6	2,60
Metabolismo Intermediario	14	58,33		12,50	7	29,17
Enfermedades Mitocondriales	21	14,79	7	11,97	4	1,73
Defectos Moléculas Complejas y Leucodistrofias	22	35,48		4,84	7	3,59

TABLA 6 - NÚMERO (N) Y PORCENTAJE DE CASOS ESTUDIADOS CON DIAGNÓSTICO POSITIVO, NO CONCLUYENTE O NEGATIVO POR CADA PANEL GENÉTICO.

4.1.1. Panel de Hipoglucemia e Hiperglucemia

Se estudiaron 43 casos a través del panel de hipoglucemia e hiperglucemia. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con hiperinsulinismo (familiar o congénito aislado), con diabetes tipo

MODY, con enfermedades de almacenamiento de glucógeno o con otras patologías cuya presentación clínica incluye hipo/hiperglucemia. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 18,60%, detectando en 8 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 7). En 9 casos (20,93%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 8) y en 26 de los 44 (60,47%), no se identificó la causa genética.

En 5 pacientes fueron identificadas variantes en genes asociados al trastorno de almacenamiento de glucógeno: en 4 de ellos (pacientes 66, 645, 763 y 764) se identificaron variantes en hemocigosis en el gen *PHKA2*, asociado al trastorno de almacenamiento de glucógeno tipo IX. En la paciente 277 se identificó una variante en homocigosis en el gen *AGL*, asociado a la glucogenosis tipo III.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes homocigotas: en el paciente 1210, en el gen *ALDOB* asociado a la intolerancia a la fructosa, y en el paciente 697, en el gen *GALT*, asociado a la galactosemia. En el paciente 4, fueron identificadas dos variantes heterocigotas compuestas en el gen *SLC22A5*, asociado a la deficiencia primaria sistémica de carnitina.

Tabla 7_Panel Hipoglucemia e Hiperglucemia - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
4	M	<i>SLC22A5</i>	AR	c.[34G>A]; [1463G>A]	p.[Gly12Ser]; [Arg488His]
66	V	<i>PHKA2</i>	XLR	c.1245+1G>T	-
277	V	<i>AGL</i>	AR	c.[100delC]; [100delC]	p.[Arg34Aspfs*1]; [Arg34Aspfs*1]
645	V	<i>PHKA2</i>	XLR	c.3547_3548insGGTGCCA TGGACACCC TGGAGA	p.Ala1184Cysfs*26
697	V	<i>GALT</i>	AR	c.[443G>A]; [443G>A]	p.[Arg148Gln]; [Arg148Gln]
763	V	<i>PHKA2</i>	XLR	c.3614C>T	p.Pro1205Leu
764	V	<i>PHKA2</i>	XLR	c.2746C>T	p.Arg916Trp
1210	M	<i>ALDOB</i>	AR	c.[448G>C]; [448G>C]	p.[Ala150Pro]; [Ala150Pro]

En 9 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 5 casos no fue posible concluir el estudio de portador por no disponer de muestras de los progenitores. En 3 casos las variantes identificadas fueron heredadas de uno de los progenitores: los casos 586 y 663 fueron heredadas en ambos casos de las madres asintomáticas de los casos índice, y en el caso 1138 la variante fue heredada del padre asintomático. En el caso 734 fue identificada una variante patogénica en heterocigosis en un gen recesivo con clínica compatible al diagnóstico de acidemia glutárica.

Tabla 8_Panel Hipoglucemia e Hiperoglucemia - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
251	V	CEL	AD	c.[1810G>C(;)1975G>C]	p.[Ala604Pro(;)Ala659Pro]
468	V	ABCC8	AD, AR	g.[(?_17464699)_(17464884_?)del(;) (?_17464241)_(17464454_?)del]	-
758	V	CPS1	AR	c.[1201G>C(;)2810T>A]	p.[Gly401Arg(;)p.Ile937Asn]
1167	V	ABCC8	AD, AR		p.Ala1002Thr
		SLC37A4	AR	c.[1225A>G(;)1022C>T]	p.[Ile409Val(;)Ala341Val]
1196	M	PHKA2	XLD	c.2911C>T	p.Arg971Cys
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
586	M	GLUD1	AD	c.272C>T	p.Thr91Ile
663	M	PHKA2	XLR	c.2870A>G	p.His957Arg
1138	V	PDX1	AD, AR	c.779G>A	p.Arg260Hist

○ Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
734	V	<i>ETFDH</i>	AR	c.1274C>G	p.Ser425*

4.1.2. Defectos del Metabolismo Intermediario

Se estudiaron 24 casos a través del panel de defectos del metabolismo intermediario. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con defectos en el metabolismo de aminoácidos, lípidos, nucleótidos y proteínas. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 58,33%, detectando en 14 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 9). En 3 casos (12,50%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 10) y en 7 de los 24 (29,17%) no se identificó la causa genética.

En 6 pacientes, el 46,2% de los pacientes con diagnóstico positivo, presentaban un diagnóstico inicial bioquímico de fenilcetonuria, con confirmación genética a través de la identificación de variantes patogénicas en el gen *PAH*, asociado a la fenilcetonuria.

En 5 pacientes fueron identificadas variantes homocigotas. En el paciente 59, en el gen *GLDC*, asociado a la encefalopatía por glicina; paciente 68, en el gen *MOCS2*, asociado a la deficiencia del cofactor molibdeno; paciente 254, una delección completa del exón 8 en el gen *TCN2*, asociado a la deficiencia de la transcobalamina 2; y en el paciente 692, en el gen *ETFDH*, asociado a la acidemia glutárica tipo IIC.

En 3 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas: paciente 22, en el gen *AMT* asociado a la encefalopatía por glicina; paciente 657, en el gen *MCCC2*, asociado a la deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa; y paciente 711, en el gen *MOCOS*, asociado a la xantineria.

En el paciente 662 fue identificada una variante hemicingota en el gen *HPRT1* asociado al síndrome de Lesch-Nyhan.

Tabla 9_Panel Defectos del Metabolismo Intermediario - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
22	V	AMT	AR	c.[2T>C]; [8781G>A]	p.[Met1Thr]; [Val905Gly]
59	V	GLDC	AR	c.[2714T>G]; [2714T>G]	p.[Val905Gly]; [Val905Gly]
68	M	MOCS2	AR	c.[244A>T]; [244A>T]	p.[Ile82Phe]; [Ile82Phe]
254	M	TCN2	AR	g.(?_31018929)_ (31019095_?)del	-
633	M	PAH	AR	c.[842C>T](;) [490A>G]	p.[Pro281Leu]; [Ile164Val]
634	V	PAH	AR	c.[782G>A]; [136G>A]	p.[Arg261Gln]; [Gly46Ser]
657	V	MCCC2	AR	c.[1015G>A]; [1423G>A]	p.[Val339Met]; [Gly475Arg]
662	V	HPRT1	XLR	c.[424A>G]; [1601C>T]	p.[Thr142Ala]; [Pro534Leu]
692	V	ETFDH	AR	c.[c.1601C>T]; [c.1601C>T]	p.[Pro534Leu]; [Pro534Leu]
711	V	MOCOS	AR	c.[2356del]; [512C>T]	p.[(Ala786Leufs*28)]; [Pro171Leu]
760	V	PAH	AR	c.[782G>A]; [1066-11G>A]	p.[Arg261Gln]; [-]
852	V	PAH	AR	c.[1162G>A]; [728G>A]	p.[Val388Met]; [Arg243Gln]
1083	V	PAH	AR	c.[1169A>G]; [116_118delTCT]	p.[Glu390Gly]; [Phe39del]
1096	V	PAH	AR	c.[261C>A]; [1315+1G>A]	p.[Ser87Arg]; [-]

En 3 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En el caso 96, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación de la variante identificada en *IDH2*. En 2 casos, fueron identificadas variantes heterocigotas en genes están asociados a patologías de herencia recesiva, pero con clínica

compatible: en el paciente 286 en el gen *UMPS*, y en el paciente 920 en el gen *PRODH*.

Tabla 10_Panel Defectos del Metabolismo Intermediario - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
96	M	<i>IDH2</i>	AD	c.419G>A	p.Arg140Gln
○ Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
286	V	<i>UMPS</i>	AR	c.1213C>T	p.Arg405*
920	V	<i>PRODH</i>	AR	c.1397C>T	p.Thr466Met

4.1.3. Enfermedades Mitocondriales

Se estudiaron 142 casos a través del panel de enfermedades mitocondriales. Estos pacientes presentaban sintomatología compatible con: defectos en los complejos OXPHOS (I, II, III y IV), deficiencias combinadas de OXPHOS, deficiencias primarias de CoQ, piruvato deshidrogenasa, depleción de ADN mitocondrial y genes que están asociados con otros defectos metabólicos pero cuya presentación clínica se podría confundir con una enfermedad mitocondrial. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 14,79%, detectando en 21 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 11). En 17 casos (11,97%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 12) y en 104 de los 142 (73,24%) no se identificó la causa genética.

En 4 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas patogénicas en genes asociados a la deficiencia aislada de algún complejo del sistema OXPHOS mitocondrial: en los pacientes 43, 235 y 389 la patología estaba asociada a la deficiencia del Complejo I (*ACAD9* y *FOXRED1*) y en el paciente 825 fue identificada una

variante homocigota en el gen *PET100* asociado a la deficiencia del Complejo IV.

En 10 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas y homocigotas en genes asociados a la deficiencia combinada afectando a varios complejos del sistema OXPHOS: paciente 403, en el gen *C12ORF65*, pacientes 163, 172, 362 y 889 en el gen *EARS2*, paciente 215 en el gen *FARS2*, pacientes 12 y 252 en el gen *GFM1*, paciente 250 en el gen *MTO1* y el paciente 65 en el gen *TSMF*.

En 3 pacientes se identificaron variantes patogénicas en genes asociados al síndrome de depleción de DNA mitocondrial: paciente 205 con variantes heterocigotas compuestas en el gen *FBXL4*; paciente 179 con una variante heterocigota *de novo* en el gen *OPA1*; y el paciente 1060 con una variante homocigota en el gen *SUCLA2*.

En 4 pacientes se identificaron variantes patogénicas en genes asociados con distintos defectos mitocondriales. Variantes heterocigotas *de novo* en los pacientes 142, en el gene *DNM1L*, asociado a la encefalopatía letal debido a defectos en la fisión peroxisomal mitocondrial; 192, en el gen *PDHA1*, asociado a la deficiencia del piruvato deshidrogenasa, respectivamente; en el paciente 292 fue identificada una variante homocigota en el gen *COX15*, asociado al síndrome de Leigh debido a la deficiencia de citocromo c oxidasa; y en el paciente 919, variantes heterocigotas compuestas fueron identificadas en el gen *COQ4*, asociado a la deficiencia primaria de la coenzima Q10.

En los pacientes 43, 163 y 362, se realizaron estudios funcionales para determinar la patogenicidad de las variantes identificadas cuyos resultados se describen en el apartado X.

Tabla 11_Panel Enfermedades Mitocondriales - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
12	M	<i>GFM1</i>	AR	c.[2011C>T]; [1401delA]	p.[Arg671Cys]; [Ser467fs]

43	V	<i>FOXRED1</i>	AR	c.[920G>A]; [733+1G>A]	p.[Gly307Glu]; [Cys240Ser]
65	V	<i>TSMF</i>	AR	c.[719G>C]; [719G>C]	p. [Cys240Ser]; [Cys240Ser]
142	M	<i>DNM1L</i>	AD, AR	c.1337G>T	p.Cys446Phe
163	V	<i>AGK</i>	AR	c.[518+1G>]; [518+1G>A]	-
		<i>EARS2</i>	AR	c.[1045G>A]; [494A>G]	p.[Glu349Lys]; [Asn165Ser]
172	V	<i>EARS2</i>	AR	c.[319C>T]; [322C>T]	p.[Arg107Cys]; [Arg108Trp]
179	M	<i>OPA1</i>	AD	c.1710T>G	p.Phe570Leu
192	V	<i>PDHA1</i>	XLR	c.787C>G	p.Arg263Gly
205	M	<i>FBXL4</i>	AR	c.[858+5G>]; [1510T>C]	p.[-]; [Cys504Arg]
				c.1256G>A	p.Arg419His
215	V	<i>FARS2</i>	AR	g.(?_5404749)_ (5404959?)del	-
235	V	<i>ACAD9</i>	AR	c.[358delT]; [809-2A>G]	p.[Phe120Fs*7]; [-]
250	V	<i>MTO1</i>	AR	c.[1450C>T]; [170G>T]	p.[Arg57Leu]; [Arg484Trp]
252	V	<i>GFM1</i>	AR	c.[640A>T]; [1199G>C]	p.[Ile214Phe]; [Arg400Pro]
292	V	<i>COX15</i>	AR	c.[649C>T]; [649C>T]	p.Arg217Trp
362	M	<i>EARS2</i>	AR	c.[670G>A]; [376C>T]	p.[Gly224Ser]; [Gln126*]
389	V	<i>ACAD9</i>	AR	c.[737T>C]; [860G>A]	p.[Ile246Thr]; [Gly287Glu]
403	V	<i>C12orf65</i>	AR	c.207_220del	p.(Pro70Asnfs*28)
825	M	<i>PET100</i>	AR	c.[1A>G]; [1A>G]	p.[Met1Val]; [Met1Val]
889	M	<i>EARS2</i>	AR	c.[184A>T]; [920T>C]	p.[Ile62Phe]; [Leu307Ser]
919	V	<i>COQ4</i>	AR	c.[202G>C]; [718C>T]	p.[Asp68His]; [Arg240Cys]
1060	V	<i>SUCLA2</i>	AR	c.[850C>T]; [850C>T]	p.[Arg284Cys]; [Arg284Cys]

En 17 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En los casos 242, 536, 599 y 1095, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios

familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En los casos 566, 592, 661 y 787, fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos . En 8 casos fueron identificadas variantes heterocigotas en genes asociados a patologías de herencia recesiva con clínica compatible.

Tabla 12_Panel Enfermedades Mitocondriales - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
242	M	DNM1L	AD, AR	c.1921G>A	p.Val641Met
536	V	SLC6A8	XLR	c.928G>A	p.Gly310Arg
599	M	PNPT1	AR	c.[1177-2A>C(; 1519G>T]	p.[-(;) Ala507Ser]
1095	M	SPG7	AD, AR	c.1529C>T	p.Ala510Val
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
566	M	NDUFB11	XL	c.152C>A	p.Pro51Gln
592	V	POLG2	AD	c.799G>A	p.Ala267Thr
661	M	LETM1	AD	c.709C>T	p.Pro237Ser
787	V	RRM2B	AD	c.139A>G	p.Ile47Val
○ Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
11	M	UPB1	AR	c.[422C>G; 423A>T]	p.[Ser141Ter; Ser141Ser]
88	V	BCS1L	AR	c.166C>T	p.Arg56*
129	V	ADCK4	AR	c.103G>A	p.Gly35Arg
130	M	ADCK4	AR	c.418G>A	p.Glu140Lys
372	M	NDUFAF2	AR	c.490delG	p.Gly164fs
544	V	PNPT1	AR	c.493C>T	p.Pro165Ser

903	V	<i>FLAD1</i>	AR	c.[1033C>T; 1589G>A]	p.[Arg345Cys; Arg530His]
943	V	<i>DARS2</i>	AR	c.396+2T>G	-
○ Otras variantes con patogenicidad indeterminada					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
847	M	<i>POLRMT</i>	-	c.[3596T>C]; [3596T>C]	p.[Leu1199Ser]; [Leu1199Ser]

4.1.4. Defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias

Se estudiaron 62 casos a través del panel de defectos en el metabolismo de moléculas complejas y Leucodistrofias. Estos pacientes presentaban sintomatología compatible con: trastornos de depósito lisosomal, biogénesis del peroxisoma, metabolismo del colesterol, síntesis de ácidos biliares y desórdenes que cursan con leucodistrofia. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 35,48%, detectando en 22 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 13). En 3 casos (4,84%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 14) y en 37 de los 63 (59,68%) no se identificó la causa genética.

En el 43% de los casos con diagnóstico positivo, fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a trastornos lisosomales. De los 10 pacientes, en 8 fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas: paciente 60, en el gen *HEXA* asociado a la enfermedad de Tay-Sachs; pacientes 234 y 848, en el gen *GBA* asociado a la enfermedad de Gaucher; paciente 1165, en el gen *GAA* asociado al trastorno del almacenamiento de glucógeno tipo II; pacientes 228 y 922, en el gen *NAGLU* asociado a la mucopolisacaridosis tipo IIIB y los pacientes 667 y 715, en el gen *SGSH* asociado a la mucopolisacaridosis tipo IIIA. En los otros 2 pacientes fueron identificadas variantes homocigotas: paciente 513 en el gen *CTSA* asociado a la galactosialidosis, y paciente 116 en el gen *GNPTAB* asociado a la mucopolisacaridosis.

En el 26% de los casos con diagnóstico positivo fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a trastornos que cursan con leucodistrofia. Se identificaron variantes heterocigotas compuestas en 4 pacientes: paciente 14, en el gen *TREX1* asociado al síndrome de Aicardi-Goutières; pacientes 98 y 231, en los genes *POLR3B* y *POLR3A*, respectivamente, asociados a la leucodistrofia hipomielinizante, y paciente 56, en el gen *TPP1*, asociado a la lipofuscinosis neuronal ceroida., sin embargo, variantes homocigotas para el mismo trastorno fueron identificadas en los pacientes 114 y 483, en los genes *PPT1* y *CLN6*, respectivamente.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes en genes asociados a trastornos del ácido siálico: una variante *de novo* en el paciente 670 en el gen *GNE*, asociado a la sialuria; y variantes heterocigotas compuestas en el paciente 137 en el gen *SLC17A5*. En 2 pacientes fueron identificadas variantes en genes asociados a trastornos peroxisomales: variantes heterocigotas compuestas en el paciente 117, en el gen *HSD17B4* asociado al síndrome de Perrault (*HSD17B4*) y variante homocigota en el paciente 368, en el gen *PEX12* asociado a trastornos de la biogénesis del peroxisoma.

En el paciente 221 fue detectada una delección de 2 bp en homocigosis en el gen *PLA2G6* asociada la distrofia neuronal axonal; y en el paciente 746, fue identificada una variante en hemicigosis en el gen *SLC16A2* asociado al síndrome de Allan-Herndon-Dudley.

Tabla 13_Panel Defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
14	M	<i>TREX1</i>	AR	c.[533G>A]; [380T>G]	p.[Pro73Leu]; [Gln135Pro]
56	V	<i>TPP1</i>	AR	c.[1325G>A]; [1273T>C]	p.[Arg208*];[-]
60	M	<i>HEXA</i>	AR	c.[1528G>A]; [531+5G>A]	p.[Arg178His]; [Leu127Arg]
98	V	<i>POLR3B</i>	AR	c.[1045_104 7del]; [1226A>G]	p.[Met415Thr]; [Glu914Lys]

114	M	<i>PPT1</i>	AR	c.[930T>A]; [930T>A]	p.[Val181Leu]; [Val181Leu]
116	V	<i>GNPTAB</i>	AR	c.[888_889d el]; [888_889del]	p.[Cys442Tyr]; [Cys442Tyr]
117	M	<i>HSD17B4</i>	AR	c.[1252G>T]; [355+1G>A]	p.[Cys425Arg]; [Asp510Asn]
137	M	<i>SLC17A5</i>	AR	c.[1080delC; 797G>A]	p.[Tyr306Ter]; [Asn413Lys]
221	V	<i>PLA2G6</i>	AR	c.[1127T>C]; [1127T>C]	p.[Gly487del]; [Gly487del]
228	V	<i>NAGLU</i>	AR	c.[197C>G];[1193G>A]	p.[-];[Leu349del]
231	V	<i>POLR3A</i>	AR	c.[155C>T]; [1562C>T]	p.[Ser793fs*3]; [Arg694His]
234	M	<i>GBA</i>	AR	c.[1693C>T]; [343C>T]	p.[Asn409Ser]; [Ser310Arg]
368	M	<i>PEX12</i>	AR	c.[-32- 13T>G]; [32- 13T>G]	p.[296_297del]; [296_297del]
483	M	<i>CLN6</i>	AR	c.[829_836d elinsCCT]; [829_836deli nsCCT]	p.[Val277Profs*5];[Val27 7Profs*5]
513	V	<i>CTSA</i>	AR	c.[533G>A]; [533G>A]	p.[Asp418Tyr]; [Asp418Tyr]
667	M	<i>SGSH</i>	AR	c.[380T>G]; [1325G>A]	p.[-]; [Val361Serfs*52]
670	M	<i>GNE</i>	AD, AR	c.[1273T>C]; [1273T>C]	p.[Arg266Gln]; [Arg266Gln]
715	V	<i>SGSH</i>	AR	c.[1528G>A]; [531+5G>A]	p.[Met376Thr]; [Ser66Trp]
746	V	<i>SLC16A2</i>	XLR	c.1045_1047 del	p.(Gln16Argfs*68)
848	V	<i>GBA</i>	AR	c.[1226A>G]; [930T>A]	p.[Arg398Gln]; [Ser52Leu]
922	M	<i>NAGLU</i>	AR	c.[888_889d el]; [1252G>T]	p.[Pro521Leu]; [Arg565Trp]
1165	V	<i>GAA</i>	AR	c.[355+1G>A]; [-32- 13T>G]	p.[Gln115*];[-]

En 3 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En los casos 31, 34 y 851, fueron identificadas variantes

heterocigotas en genes asociados a patologías de herencia recesiva con clínica compatible (Tabla 11).

Tabla 14_Panel Defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible

Paciente	Sexo	Ge	H	Variante	Proteína
31	M	PPT1	AR	c.2T>C	p.Met1Thr
34	M	CLN6	AR	c.314C>T	p.Pro105Leu
851	M	RNASEH2B	AR	c.655T>C	p.Tyr219His

4.2. ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

En total se estudiaron 517 pacientes con sospecha de enfermedad neurológica. En la tabla 15 se muestran el número (N) y porcentaje de casos diagnosticados según el panel analizado.

Panel	Diagnosticados		No Concluyentes		Negativos	
	N	%	N	%	N	%
<i>Epilepsia</i>	52	23,01%	68	30,09%	106	46,90%
<i>Defectos Morfogénesis Cerebral</i>	18	25,35%	11	15,49%	42	59,15%
<i>Discapacidad Intelectual</i>	2	4,76%	10	23,81%	30	71,43%
<i>Neuromuscular</i>	31	36,90%	27	32,14%	26	30,95%
<i>Desordenes del Movimiento</i>	7	10,29%	14	20,59%	47	69,12%
<i>Ciliopatías</i>	10	38,46%	3	11,54%	13	50,00%

TABLA 15 - NÚMERO (N) Y PORCENTAJE DE CASOS ESTUDIADOS CON DIAGNÓSTICO POSITIVO, NO CONCLUYENTE O NEGATIVO POR CADA PANEL GENÉTICO.

4.2.1. Epilepsia

Se estudiaron 226 casos a través del panel de epilepsias. Estos pacientes presentaban sintomatología compatible con: encefalopatía epiléptica, espectro de crisis febril plus, epilepsia neonatal, epilepsia mioclónica, síndrome de Dravet, síndrome de Rett, síndrome de West o genes que están asociados con otros defectos metabólicos pero cuya presentación clínica, principalmente convulsiones, se podría confundir con una enfermedad epiléptica. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 23,01%, detectando en 52 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 16). En 68 casos (30,09%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 17) y en 106 de los 226 (46,90%) no se identificó la causa genética.

En 74% de los pacientes con diagnóstico positivo fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a encefalopatía epiléptica como: *ARHGEF9* (1/52), *ARX* (1/52), *CDKL5* (6/52), *DNM1* (1/52), *GNAO1* (1/52), *HCN1* (1/52), *HNRNPU* (1/52), *KCNA2* (1/52), *KCNQ2* (7/52), *RHOBTB2* (1/52), *SCN1A* (14/52), *SCN2A* (2/52), *SCN8A* (1/52), *SLC12A5* (1/52), *STXBPI* (1/52) y *TBC1D24* (1/52).

En el 72% de los pacientes con diagnóstico positivo fueron identificadas variantes heterocigotas *de novo*. En 7 pacientes en el gen *KCNQ2*, 9 pacientes en el gen *SCN1A*, 6 pacientes en el gen *CDKL5* y en 3 pacientes en el gen *FOXG1*, asociado al síndrome de Rett congénito. En los demás pacientes fueron identificados 1 o 2 casos con variantes *de novo* en un único gen como *SCN8A*, *ARHGEF9*, *GRIN2A*, *HNRNPU*, *ARX*, *STXBPI*, *HCN1*, *RHOBTB2*, *KCNA2*, *DHDDS* y *GNAO1*. Fueron también identificadas dos CNVs *de novo* en 2 pacientes: en el paciente 71 fue identificada una macrodelección que incluye genes asociados al funcionamiento de los canales de sodio, *SCN1A*, *SCN2A* y *SCN9A*. Y en el paciente 1058 fue identificada una delección que incluye los exones 2 al 8, en el gen *ILIRAPLI*, asociado a la discapacidad intelectual con convulsiones.

En 4 pacientes fueron identificadas variantes en genes asociados a trastornos epilépticos de herencia recesiva. En 3 pacientes fueron

identificadas variantes homocigotas, y en dos de ellos, en genes asociados a la encefalopatía epiléptica de infancia: en el paciente 421, en el gen *TBC1D24* y en el paciente 501, en el gen *SLC12A5*; y en el paciente 561, en el gen *RFT1* asociado a trastorno congénito de la glicosilación. En el paciente 954 fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas en el gen *PROSC*, asociado a la epilepsia de inicio temprano, dependiente de vitamina B6.

En 5 pacientes las variantes identificadas en heterocigosis han sido heredadas de uno de los progenitores. En 4 pacientes se confirmó segregación de la enfermedad en la familia materna por la identificación de variantes patogénicas en los genes *SCN1A* (pacientes 548 y 829), en el gen *CLCN4* (paciente 901) y en el gen *MTOR* (paciente 918), asociado al síndrome de Smith-Kingsmore. En el paciente 1112 la variante en el gen *SCN1A* ha sido heredada del padre afecto. Los pacientes 501 y 968, son hermanos y comparten algunas variantes patogénicas heredadas de los progenitores en los genes *SCN1A* y *SLC12A5*.

En 2 pacientes varones, 572 y 1117, aunque el estudio familiar no fue realizado, el diagnóstico fue determinado como positivo por la identificación de variantes patogénicas en hemicigosis en genes asociados con la clínica presentada, *MECP2* asociado al síndrome de Rett, y *CLCN4* asociado al síndrome de Raynaud-Claes, respectivamente.

Tabla 16_Panel de Epilepsia - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
9	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.319C>T	p.Leu107Phe
26	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.1657C>T	p.Arg553Trp
47	M	<i>CDKL5</i>	XL	c.176G>C	p.Arg59Pro
52	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.4352C>T	p.Pro1451Leu
71	M	<i>SCN1A</i> <i>SCN2A</i>	-	g.(?_166847704)_(166930181_?)dup g.(?_166152283)_(166246384_?)dup	-

		<i>SCN9A</i>		g.(?_167055131)_1 67168316_?)dup	
90	V	<i>KCNQ2</i>	AD	c.821C>T	p.Thr274Met
91	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.388G>A	p.Glu130Lys
131	M	<i>CDKL5</i>	XL	c.455G>A	p.Cys152Tyr
155	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.917C>T	p.Ala306Val
156	M	<i>CDKL5</i>	XL	c.2635_2636del	p.Leu879Glufs*30
158	V	<i>KCNQ2</i>	AD	c.850T>G	p.Tyr284Asp
186	M	<i>ARHGEF9</i>	XLR	c.541G>C	p.Gly181Arg
202	M	<i>CDKL5</i>	XL	c.163_166del	p.(Glu55Argfs*20)
218	M	<i>GRIN2A</i>	AD	c.2069C>T	p.Thr690Met
310	V	<i>HNRNPU</i>	AD	c.401_402delAC	p.Asp134fs*62
385	V	<i>MECP2</i>	XLD, XLR	c.1350C>G	p.Tyr450Ter
406	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.2728C>T	p.Gln910Ter
420	M	<i>FOXP1</i>	AD	c.764G>A	p.Trp255Ter
421	V	<i>TBC1D24</i>	AR	c.724C>T	p.Arg242Cys
427	V	<i>FOXP1</i>	AD	c.256C>T	p.Gln86Ter
472	V	<i>CDKL5</i>	XL	c.2413C>T	p.Gln805Ter
473	M	<i>CDKL5</i>	XL	c.616G>T	p.Asp206Tyr
475	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.778C>T	p.His260Tyr
481	V	<i>DNM1</i>	AD	c.442C>A	p.Gln148Lys
501	V	<i>SCN1A</i> <i>SLC12A5</i>	AD AR	c.2785C>T c.[3274G>A]; [3274G>A]	p. Leu929Phe p.[Glu1092Lys]; [Glu1092Lys]
545	M	<i>ARX</i>	XLD, XLR	c.1039T>G	p.Phe347Val
548	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.4973C>T	p.Thr1658Met
561	V	<i>RFT1</i>	AR	c.[47C>G]; [47C>G]	p.[Ser16Cys]; [Ser16Cys]
572	V	<i>MECP2</i>	XLR	c.917G>A	p.Arg306His
597	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.4997C>T	p.Ser1666Phe
598	V	<i>STXBP1</i>	AD	c.416C>T	p.Pro139Leu
651	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.664C>T	p.Arg222*
658	V	<i>HCN1</i>	AD	c.1172G>A	p.Gly391Asp
660	V	<i>SCN8A</i>	AD	c.2620G>A	p.Ala874Thr

RESULTADOS

685	V	<i>RHOBTB2</i>	AD	c.1531C>T	p.Arg511Trp
716	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.2020_2023del	p.(Asp674Serfs*15)
759	M	<i>SCN2A</i>	AD	c.2995G>A	p.Glu999Lys
829	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.5456C>A	p.Ala1819Glu
832	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.338C>G	p.Pro113Arg
860	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.493T>C	p.Tyr165His
868	M	<i>KCNA2</i>	AD	c.959C>T	p.Thr320Ile
872	V	<i>FOXG1</i>	AD	c.565C>T	p.Leu189Phe
901	V	<i>CLCN4</i>	XLD, XLR	c.1576G>A	p.Gly526Ser
918	V	<i>MTOR</i>	AD	c.7249G>A	p.Val2417Met
954	V	<i>PROSC</i>	AR	c.[157A>G]; [445G>A]	p.[Met53Val]; [Gly149Arg]
968	M	<i>SCN1A</i> <i>CACNA1A</i> <i>SLC12A5</i>	AD AD AR	p.Leu929Phe p.Arg1060His c.[3274G>A]; [3274G>A]	p.Leu929Phe p.Glu1092Lys p.[Arg1060His]; [Arg1060His]
1058	V	<i>IL1RAPL1</i>	XLR	g.(?_28807412)_(29 938236_?)del	-
1112	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.5009T>C	p.Leu1670Ser
1177	V	<i>CLCN4</i>	XL	c.1597G>A	p.Val533Met
1197	V	<i>DHDDS</i>	AD, AR	c.110G>A	p.Arg37His
1198	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.4658T>C	p.Leu1553Pro
1208	M	<i>GNAO1</i>	AD	c.607G>A	p.Gly203Arg

En 68 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 40 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 28 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos. En 5 casos, 30, 530, 819, 933 y 1049, fueron identificadas variantes heterocigotas en genes asociados a patologías de herencia recesiva con clínica compatible. En el caso 530 se ha confirmado herencia de la madre y de la abuela materna, ambas afectas, de una CNV en el gen *GPHN*, asociado a la deficiencia del cofactor de molibdeno con herencia recesiva.

Tabla 17_Panel Enfermedades Epilepsia - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
37	M	<i>PRRT2</i>	AD	g.(?_29824300)_(29826034_?)del	-
84	V	<i>KCNQ3</i>	AD	c.899T>C	p.Phe300Ser
102	M	<i>KCNQ3</i>	AD	c.605-10T>C	-
207	M	<i>PRRT2</i>	AD	c.649_650insC	p.Ala217Profs*8
314	M	<i>SCN2A</i>	AD	c.4303C>T	p.Arg1435*
379	M	<i>SCN2A</i>	AD	c.952G>A	p.Glu318Lys
485	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.829A>T	p.Thr277Ser
514	V	<i>CACNA1H</i>	AD	c.634C>T	p.Arg212Cys
606	V	<i>GNAO1</i>	AD	c.901G>C	p.Val301Leu
627	V	<i>SYN1</i>	XL	c.1297C>T	p.His433Tyr
629	V	<i>PRRT2</i>	AD	c.640_641insC	p.Ala214fSer
652	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.4822G>T	p.Asp1608Tyr
676	V	<i>GABBR2</i>	AD	c.1858C>A	p.Pro620Thr
738	M	<i>FOXP1</i>	AD	c.458G>T	p.Gly153Val
781	V	<i>SCN2A</i>	AD	c.5117G>C	p.Cys1706Ser
782	V	<i>SRGAP2</i>	AD	g.(?_206579711)_(206634815_?)dup	-
810	V	<i>SMARCA1</i>	XL	c.1584G>A	p.Glu528Glu
857	M	<i>ARHGEF15</i>	AD	c.709_723delGTC CCCCGTCGGGCC	p.Val237_Ala241del
859	M	<i>SLC35A2</i>	XL	c.636_657delACA GCAAGCCGGTGG GGGAGGC	p.(Gln213Hisfs*157)
884	M	<i>ARHGEF9</i>	XLR	c.1454G>T	p.Gly485Val
937	V	<i>SCN1A</i>	AD	c.2837G>A	p.Arg946His
951	V	<i>DEPDC5</i>	AD	g.(?_32200123)_(32200234_?)del	-
957	V	<i>KCNT1</i>	AD	c.785G>A	p.Arg262Gln
965	M	<i>MECP2</i>	XL	c.1417G>T	p.Glu473*
975	V	<i>PRRT2</i>	AD	c.649dupC	p.Arg217fs

RESULTADOS

981	V	<i>HCN1</i>	AD	c.715G>T	p.Val239Leu
1030	M	<i>FGF12</i>	AD	c.341G>A	p.Arg114His
1038	V	<i>SCN8A</i>	AD	c.4633A>C	p.Thr1545Pro
1068	V	<i>KCNC1</i>	AD	c.88C>T	p.Pro30Ser
1073	M	<i>EFHC1</i>	AD	c.694C>T	p.Leu232Phe
1078	M	<i>CASR</i>	AD	c.736T>G	p.Tyr246Asp
1126	V	<i>SLC6A1</i>	AD	c.373G>A	p.Val125Met
1127	M	<i>CDKL5</i>	XL	c.380A>T	p.His127Leu
1129	M	<i>PRRT2</i>	AD	c.649dupC	p.Arg217fs
1173	V	<i>SCN10A</i>	AD	c.5694delA(;)3800 T>G	p.(Ala1899Glnfs*36) (;) Met1267Arg
1191	V	<i>KCNQ5</i>	AD	c.740G>A	p.Arg247Gln
1213	V	<i>NPRL3</i>	AD	c.138delC	p.Tyr46*

o Variante heredada de uno de los progenitores

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
29	M	<i>JRK</i>	-	c.1228C>G	p.Pro410Ala
33	M	<i>SCN9A</i>	AD	c.53A>T	p.Gln18Leu
93	V	<i>SCN9A</i>	AD	c.469T>C	p.Tyr157His
245	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.3924A>T	p.Glu1308Asp
268	V	<i>KCNT1</i>	AD	c.1421G>T	p.Arg474Leu
337	V	<i>DEPDC5</i>	AD	c.2526G>C	p.Gln842His
510	M	<i>CACNA2D1</i>	AD	c.3274T>C	p.Ter1092Argext*25
519	V	<i>RBFOX1</i>	AD	g.(?_6366971)_(6367083_?)del	-
519	V	<i>RBFOX1</i>	AD	g.(?_6704579)_(6704676_?)del	-
530	V	<i>GPHN</i>	AR	g.(?_67291192)_(67291284_?)del	-
530	V	<i>GPHN</i>	AR	g.(?_67243182)_(67243239_?)del	-
647	V	<i>SPTAN1</i>	AD	c.433C>G	p.Leu145Val
650	V	<i>FOXG1</i>	AD	c.655C>G	p.Arg219Gly
682	M	<i>RYR3</i>	AD	c.13490G>A	p.Cys4497Tyr
703	V	<i>SCN2A</i>	AD	c.5551C>T	p.Arg1851Trp

727	M	<i>CHRNA4</i>	AD	c.1825G>A	p.Val609Ile
740	V	<i>SYN1</i>	XL	c.376T>A	p.W126R
744	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.1588G>A	p.Glu530Lys
754	V	<i>GABRB1</i>	AD	c.157C>T	p.Arg53Trp
801	M	<i>SCN1A</i>	AD	c.1604G>A	p.Arg535His
875	V	<i>KCNQ2</i>	AD	c.1016T>A	p.Leu339Gln
887	V	<i>CHRNA4</i>	AD	c.803C>T	p.Pro268Leu
904	V	<i>GABRG2</i>	AD	c.824G>A	p.Trp275*
938	M	<i>GABRB1</i>	AD	c.775A>G	p.Ile259Val
940	V	<i>GRIN2A</i>	AD	c.837C>T	p.Val279Val
996	V	<i>NPRL2</i>	AD	c.949G>A	p.Gly317Arg
1008	V	<i>KCNT1</i>	AD	c.2912_2913delins AT	p.(Ser971Asn)
1099	V	<i>HECW2</i>	AD	c.900C>A	p.Ser300Arg
1119	M	<i>SYN1</i>	XL	c.718G>A	p.Gly240Arg

o Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
30	V	<i>PNKP</i>	AR	c.1360C>A	p.Leu454Met
530	V	<i>GPHN</i>	AR	g.(?_67291192)_ 67291284_?)del	-
819	V	<i>GPHN</i>	AR	g.(?_67243182)_ 67243239_?)del	-
933	V	<i>SYNJ1</i>	AR	c.2714T>C	p.Ile905Thr
1049	V	<i>CNTNAP2</i>	AR	c.1418C>T	p.Thr473Ile

4.2.2. Defectos de la Morfogénesis Cerebral

Se estudiaron 71 casos a través del panel de defectos de la morfogénesis cerebral. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con microcefalia, macrocefalia, megalencefalia, y hemimegalencefalia,

holoprosencefalia, esquisencefalia, lisencefalia tipo I y II, heterotopías neuronales, agenesia de cuerpo caloso, hipoplasia pontocerebelar, disgenesias cerebrales, displasia cortical. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 23,94%, detectando en 18 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 18). En 11 casos (16,90%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 19) y en 42 de los 71 (59,15%) no se identificó la causa genética.

En 4 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas: en genes asociados a la lisencefalia, como los pacientes 112 en el gen *RELN* y paciente 118, en el gen *KNLI*; y genes asociados a la hipoplasia pontocerebelosa como los pacientes paciente 223 en el gen *TSEN54* y paciente 503, en el gen *TSEN2*.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes homocigotas: paciente 467, en el gen *TUBGCP6* asociado a la microcefalia; y el paciente 927, en el gen *ADGRG1* asociado a la polimicrogiria frontoparietal bilateral.

En 12 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas en genes asociados a patologías de herencia dominante, de estos, en 9 de ellos las variantes identificadas eran *de novo*: pacientes 48 y 121, en el gen *PAFAH1B1* asociado a la lisencefalia; pacientes 86 y 422, en el gen *PIK3R2* asociado al Síndrome de megalencefalia- polimicrogiria- polidactilia- hidrocefalia; paciente 430, en el gen *SHH* asociado a la holoprosencefalia; paciente 517, en el gen *KIF11* asociado a la microcefalia; paciente 581, en el gen *TUBB2A* asociado a la displasia cortical compleja; y pacientes 581 y 995, en el gen *EFTUD2* asociado a la disostosis mandibulofacial. Además, variantes patogénicas heterocigotas fueron identificadas en genes en el cromosoma X: en el gen *DCX* asociado a la lisencefalia: paciente 69, mujer con variante heredada de la madre sintomática; y el paciente 480, varón con variante patogénica hemicigota en el mismo gen; el paciente 331, fue identificada una variante posiblemente patogénica en el gen *SRPX2*, asociado a la epilepsia rolándica con discapacidad intelectual.

Tabla 18_Panel Defectos de la Morfogénesis Cerebral - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Ge	H	Variante	ACMG
48	V	<i>PAFAH1B1</i>	AD	g.(?_2583433)_(2585146_?)del	-
69	M	<i>DCX</i>	XLD	c.191C>T	p.Pro64Leu
86	M	<i>PIK3R2</i>	AD	c.1117G>A	p.Gly373Arg
112	V	<i>RELN</i>	AR	c.[10112G>T]; [8809G>A]	p.[Trp3371Leu]; [Ala2937Thr]
118	M	<i>KNL1</i>	AR	c.[1599A>G]; [6427G>T]	p.[Gln533Gln]; [Asp2143Tyr]
121	V	<i>PAFAH1B1</i>	AD	g.(?_2541532)_(2541639_?)del	-
223	M	<i>TSEN54</i>	AR	c.[371G>T]; [919G>T; 277T>C]	p.[Gly124Val]; [Ala307Ser; Ser93Pro]
331	V	<i>SRPX2</i>	XL	c.559C>T	p.Pro187Ser
422	M	<i>PIK3R2</i>	AD	c.1117G>A	p.Gly373Arg
430	V	<i>SHH</i>	AD	c.143delT	p.Ile48Thrfs*9
467	V	<i>TUBGCP6</i>	AR	c.[4315+2_4315+3delTG]; [4315+2_4315+3delTG]	-
480	V	<i>DCX</i>	XLD	c.266T>C	p.Phe89Ser
503	V	<i>TSEN2</i>	AR	c.[1037A>G]; [353_354del]	p.[Tyr346Cys]; [Gln118Argfs*4]
517	V	<i>KIF11</i>	AD	c.2971_2972insT	p.(Ser992Lysfs*24)
581	V	<i>TUBB2A</i>	AD	c.743C>T	p.Ala248Val
723	M	<i>EFTUD2</i>	AD	c.259C>T	p.Gln87*
927	V	<i>ADGRG1</i>	AR	c.[1504C>T]; [1504C>T]	p.[Arg502*]; [Arg502*]
995	M	<i>EFTUD2</i>	AD	c.2562-2_2562-1delAG	-

En 11 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 5 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los

progenitores asintomáticos, los casos 119 y 439, las variantes fueron heredadas de la madre y en el caso 678, heredada del padre. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas en genes asociados a patologías de herencia recesiva con clínica compatible.

Tabla 19_Panel Defectos de la Morfogénesis Cerebral - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
216	M	ZIC2	AD	c.1392_1403del	p.464_468del
323	M	CASC5	AR	c.75+6A>G(;)5142 G>C	p.-(;)[Pro1714Pro
607	M	TUBB2B	AD	c.728C>T	p.Pro243Leu
710	M	DCX	XLD, XLR	c.829C>T	p.Arg277Cys
982	M	FLNA	XLD, XLR	c.5959G>C	p.Glu1987Gln
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
119	M	CASK	XL	g.(?_41524505)_ (4 1519839_?)dup	-
439	V	PIK3CA	-	c.2530T>C	p.Cys844Arg
678	M	CCND2	AD	c.553A>T	p.Ile185Phe
○ Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
111	V	ARFGF2	AR	c.625G>A	p.Glu209Lys
122	M	MED17	AR	c.602A>G	p.Asp201Gly
718	V	SNAP29	AR	g.(?_21213348)_ (2 1242174_?)del	-

4.2.3. Discapacidad Intelectual

Se estudiaron 42 casos a través del panel de Discapacidad Intelectual. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con discapacidad intelectual asociada con otras presentaciones clínicas como retraso psicomotor, defectos de la morfogénesis cerebral o autismo. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 4,76%, detectando en 2 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 20). En 10 casos (23,81%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 21) y en 30 de los 42 (71,43%) no se identificó la causa genética.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas patogénicas. En el paciente 1102, fue identificada una variante *de novo* en el gen *ADNP* asociado al síndrome de Helsmoortel-van der Aa; y en el paciente 1128, fue identificada una variante en hemicigosis en el gen *L1CAM*, asociado a la agenesia parcial de cuerpo caloso

Tabla 20_Panel Discapacidad Intelectual - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Variante
1102	V	<i>ADNP</i>	AD	c.56_57delTG	p.(Val19Glufs*5)
1128	V	<i>L1CAM</i>	XLD, XLR	c.2750-2A>G	-

En 10 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 7 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos, los casos 1100 y 1152, las variantes fueron heredadas del padre y en el caso 789, heredada de la madre.

Tabla 21_Panel Discapacidad Intelectual - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
615	V	AUTS2	AD	c.1603_1626del	p.(His535_Thr542del)
646	V	GRIN2B	AD	c.3076G>A(;)3004G>C	p.Gly1026Ser(;)Gly1002Arg
772	V	GRIK2	AR	g.(?_102483191)_102483466?)del g.(?_102483466)_102250338?)del	-
840	V	HIVEP2	AD	c.6036C>A	p.Asp2012Glu
1045	M	GNB1	AD	c.217G>A	p.Ala73Thr
1180	M	DDX3X	XLD	c.1474delA	p.(Ser492Alafs*4)
1194	M	AHDC1	AD	c.4660_4668delGACTCGCTG	p.Asp1554_Leu1556del
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
789	V	ZMYM3	XL	c.2074G>A	p.Glu692Lys
1100	V	SETD5	AD	c.3668C>T	p.Ser1223Leu
1152	V	SYNGAP1	AD	c.1330A>C	p.Lys444Gln

4.2.4. Enfermedades Neuromusculares

Se estudiaron 84 casos a través del panel de enfermedades neuromusculares. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con distrofias musculares (cintura escapular, congénita de Ullrich, de Duchenne, Emery-Dreifuss), miopatías congénitas, miopatías distales, miopatías metabólicas, enfermedades de la unión neuromuscular, amiotrofias espinales, y neuropatías hereditarias. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 36,90%, detectando en 31 pacientes la causa molecular de su patología

(tabla 22). En 27 casos (32,14%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 23) y en 26 de los 84 (30,95%) no se identificó la causa genética.

En 11 pacientes fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a la distrofia muscular de varios tipos. En 5 pacientes las variantes estaban localizadas en genes asociados a la distrofia muscular de cinturas: variantes heterocigotas compuestas fueron detectadas en los pacientes 211, en el gen *CAPN3*, y en la paciente 358, en el gen *SGCA*; variantes homocigotas fueron detectadas en los pacientes 144, en el gen *TCAP*, y en los pacientes 543 y 988 en el gen *SGCG*. En la paciente 565, fue identificada una variante heterocigota en el gen *COL6A3*, asociado a la distrofia muscular de Ullrich. En 4 pacientes fueron identificadas variantes en el gen *DMD*, asociado a la distrofia muscular de Duchenne: en los pacientes 798, 850 y 1203 fueron detectadas variantes en hemicigosis, y en la paciente 880, una variante heterocigota *de novo* fue identificada en el mismo gen. En la paciente 325, fue identificada una variante homocigota en el gen *SYNE1*, asociado a la distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

En 7 pacientes fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a neuropatías como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: variantes heterocigotas compuestas en los pacientes 373, en el gen *IGHMBP2*, y en el paciente 635, en el gen *SH3TC2*; variantes heterocigotas *de novo* en los pacientes 529, en el gen *MPZ*, en el paciente 766 en el gen *MFN2*, y en el paciente 908, en el gen *DNM2*; una variante homocigota fue identificada en la paciente 361, en el gen *SH3TC2*, y una variante hemicigota en el paciente 800, en el gen *GJB1*. En la paciente 282 fue identificada una variante homocigota en el gen *HINT1* asociado a la neuromiotonia y neuropatía axonal.

En 3 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas en el gen *TTN* asociado a miopatía congénita: pacientes 72, 299 y 343. En el paciente 146, fue detectada una isodisomía materna en el gen *TTN* (resultados descritos en el apartado 4.7).

En 4 pacientes fueron identificadas variantes *de novo*: en genes asociados a la miopatía congénita relacionada con cardiomiopatía, como el paciente 195, con una variante hemicigota en el gen *TAZ*, y el paciente 255, con una variante heterocigota en el gen *MYH7*; y en el gen *KBTBD13*, asociado a la miopatía nemalínica, como los pacientes 197 y 876.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes en genes asociados al síndrome congénito miasténico: una variante en homocigosis, en el paciente 81, en el gen *CHRNE*, y variantes heterocigotas compuestas en la paciente 431 en el gen *DPAGT1*.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes homocigotas: en el paciente 101 fue identificada una variante patogénica en el gen *GYG1*, asociado a miopatía metabólica por trastorno de almacenamiento de glucógeno; y en la paciente 282, fue detectada una CNV en el gen *SIGMAR1*, asociado a la atrofia muscular espinal.

Tabla 22_Panel de Enfermedades Neuromusculares - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Proteína	ACMG
72	V	<i>TTN</i>	AD, AR	c.[12411delT]; [105110_105111delCC]	p.[Ser4137ArgfsTer31]; [Thr35037AsnfsTer9]
81	V	<i>CHRNE</i>	AD, AR	c.[583G>C]; [583G>C]	p.[Asp195His]; [Asp195His]
101	M	<i>GYG1</i>	AR	c.[46G>C]; [46G>C]	p.[Ala16Pro]; [Ala16Pro]
144	V	<i>TCAP</i>	AR	c.[255C>A]; [255C>A]	p.[Tyr85*]; [Tyr85*]
146	V	<i>TTN</i>	AR	c.38661_38665del	p.12885_12887del
195	V	<i>TAZ</i>	XLR	c.527A>G	p.His176Arg
197	V	<i>KBTBD13</i>	AD	c.290T>C	p.Leu97Pro
211	V	<i>CAPN3</i>	AR	c.[1962delC]; [2120A>G]	p.[Phe654fSeArg*7]; [Asp707Gly]
255	V	<i>MYH7</i>	AD	c.1606G>A	p.Glu536Lys

282	M	<i>SIGMAR1</i>	AR	g.(?_34635615)_(3 4635855_?)del	-
299	V	<i>TTN</i>	AD, AR	c.[3034C>T]; [106531+1G>A]	p.[Arg1012*];[-]
325	M	<i>SYNE1</i>	AR	c.[26095-1G>T]; [26095-1G>T]	-
343	M	<i>TTN</i>	AD, AR	c.[33064C>T]; [102941G>A]	p.[Arg11022*]; [Gly34314Asp]
358	M	<i>SGCA</i>	AR	c.[724G>T]; [739G>A]	p.[Val242Phe]; [Val247Met]
361	M	<i>SH3TC2</i>	AR	c.[3325C>T]; [3325C>T]	p.[Arg1109*]; [Arg1109*]
373	M	<i>IGHMBP2</i>	AR	c.[181G>A]; [1327C>T]	p.[Gly61Arg]; [Arg443Cys]
431	M	<i>DPAGT1</i>	AR	c.[1150C>G]; [574G>C]	p.[Leu384Val]; [Gly192Arg]
529	M	<i>MPZ</i>	AD	c.369C>T	p.Gly123Gly
543	M	<i>SGCG</i>	AR	c.[848G>A]; [848G>A]	p.[Cys283Tyr]; [Cys283Tyr]
565	M	<i>COL6A3</i>	AD, AR	c.6210+5G>A	-
635	V	<i>SH3TC2</i>	AR	c.[2640delC]; [2860C>T]	p.[Ala880fSer]; [Arg954*]
637	V	<i>HINT1</i>	AR	c.[110G>C]; [110G>C]	p.[Arg37Pro]; [Arg37Pro]
766	M	<i>MFN2</i>	AD, AR	c.326A>G	p.Lys109Arg
798	V	<i>DMD</i>	XL	c.9622A>G	p.Lys3208Glu
800	V	<i>GJB1</i>	XL	c.547C>T	p.Arg183Cys
850	V	<i>DMD</i>	XL	c.9563+1G>A	-
876	V	<i>KBTBD13</i>	AD	c.244G>A	p.Val82Met
880	M	<i>DMD</i>	XL	c.5697dupA	p.(Leu1900Ilefs*6)
908	M	<i>DNM2</i>	AD, AR	c.1856C>T	p.Ser619Leu
988	M	<i>SGCG</i>	AR	c.[525delT]; [525delT]	p.[Phe175Leufs*2 0]; [Phe175Leufs*20]
1203	V	<i>DMD</i>	XL	g.(?_32404402)_(3 2503241_?)del	-

En 27 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 17 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para

determinar la segregación las variantes identificadas. En 9 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos. En 1 caso fue identificada una variante heterocigota en genes asociados a patologías de herencia recesiva con clínica compatible.

Tabla 23_Panel Enfermedades Neuromusculares - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
35	V	SCN4A	AD	c.4774A>G	p.Met1592Val
133	M	COL6A1	AD	c.868G>A	p.Gly290Arg
280	M	REEP1	AD	c.349G>C	p.Ala117Pro
283	M	RYR1	AD, AR	c.10347+1G>A	-
303	V	CAPN3	AD	c.2361_2362in sTCAT	p.Val787fSer
326	V	REEP1	AD	c.164C>T	p.Thr55Ile
338	M	CHRNB1	AD	c.309C>G	p.Ile103Met
387	V	CLCN1	AD, AR	c.2234A>G	p.Asp745Ser
507	V	RYR1	AD, AR	c.4837C>T(; 13672C>T(; 7027G>A	p.Gln1613*(; Arg4558Trp(;)Gly2 343Ser
509	M	ACTA1	AR	c.529A>G(; 809-2A>T	p.Ile177Val(;) -
596	V	COL12A1	AD, AR	c.8215T>C(; 6995G>A	p.Cys2739Arg(;)Tr p2332*
620	V	STIM1	AD	c.247G>T	p.Val83Leu
630	M	TTN	AR	c.38737G>T(; 87019_87022d el	p.Glu12913*(; 29007_29008del
749	V	DST	AR	c.822A>G(; 4777A>C	p.Glu274Glu(; Ile1593Leu
790	M	COL6A2	AD, AR	c.875G>A	p.Gly292Asp
1155	M	DMD	XL	c.3125delA	p.(Lys1042Serfs*2)
1216	M	FKRP	AR	c.545A>G(; 898G>A(; 822C>G	p.Tyr182Cys(;)Val 300Met(;)Ile274M et

o Variante heredada de uno de los progenitores

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
10	V	<i>MYH7</i>	AD	c.4421C>A	p.Ala1474Asp
50	M	<i>COL6A1</i>	AD, AR	c.2166_2167in sC	p.Ile723Hisfs*7
185	V	<i>RYR1</i>	AR	c.2709C>G	p.His903Gln
209	V	<i>COL6A2</i>	AD, AR	c.1806C>A	p.Cys602*
249	V	<i>MYH2</i>	AD, AR	c.4205G>A	p.Arg1402Gln
349	M	<i>GDAP1</i>	AR	c.487C>T	p.Gln163*
375	V	<i>INF2</i>	AD	c.1580_1581in sC	p.Val530fs*49
793	V	<i>TRAPPC11</i>	AR	c.[1568- 1G>A(;) 2147C>G]	p.-(; Ala716Gly
900	M	<i>SLC52A2</i>	AR	c.595delG	p.(Ala199Hisfs*2)

o Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
465	V	<i>LAMA2</i>	AR	c.149C>T	p.Ala50Val

4.2.5. Ataxias y Trastornos del Movimiento

Se estudiaron 68 casos a través del panel de ataxias y trastornos del movimiento. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con distonía, ataxia, corea, paraparesia espástica, hiperlaxitud y osteogénesis. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 10,29%, detectando en 7 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 24). En 14 casos (20,59%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 25) y en 47 de los 68 (69,12%) no se identificó la causa genética.

En 4 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas: 2 *de novo* en los pacientes 288 y 376, en los genes *KCND3* y *ITPR1*, asociados a la ataxia espinocerebelosa; y en el paciente 154, fue

identificada una variante heterocigota heredada del padre afecto, en el gen *SGCE*, asociado a la distonía mioclónica. En la paciente 138, fue identificada una variante de significado incierto en el gen *FLNA*, asociado al síndrome de FG, variante heredada del padre oligosintomático.

En 2 pacientes fueron identificadas variantes homocigotas: en el paciente 511 en el gen *HPCA*, asociado a la distonía de torsión; y en el paciente 1182 en el gen *SACS*, asociado a la ataxia espástica.

En 1 paciente fueron identificadas variantes heterocigotas: paciente 580 en el gen *ATM* asociado a la ataxia-telangiectasia.

Tabla 24_Panel de Ataxias y Trastornos del Movimiento - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Proteína	ACMG
138	M	<i>FLNA</i>	XL	c.6370G>A	p.Val2124Met
154	V	<i>SGCE</i>	AD	c.600_601insG	p.Asn200fs
288	V	<i>KCND3</i>	AD	c.1111G>A	p.Gly371Arg
376	M	<i>ITPR1</i>	AD	c.722G>A	p.Arg241Lys
511	V	<i>HPCA</i>	AR	c.25C>T	p.Arg9Trp
580	V	<i>ATM</i>	AR	c.[652C>T]; [8484delA]	p.[Gln218*]; [Gln2828Hisfs*29]
1182	M	<i>SACS</i>	AR	g.(?_23942516)_ (23942651_?)del	-

En 14 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 10 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos, en el caso 915, la variante fue heredada del padre y de los tíos paternos, pero la información clínica disponible no ha permitido confirmar o descartar la segregación de la variante.

Tabla 25_Panel de Trastornos del Movimiento - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
132	V	<i>CAMTA1</i>	AD	c.1277A>G	p.Asp426Gly
214	M	<i>PLOD1</i>	AR	c.2169_2171del	p.Phe724del
290	V	<i>FBN1</i>	AD	c.5927A>G	p.Glu1976Gly
398	M	<i>COL6A3</i>	AD, AR	c.1576G>A	p.Gly526SeArg
486	V	<i>ANO3</i>	AD	c.1787C>A	p.Ser596Tyr
636	V	<i>ANO10</i>	AR	c.1715C>A	p.Ala572Glu
733	M	<i>TNXB</i>	AD	c.877G>T	p.Gly293Trp
736	M	<i>CACNA1A</i>	AD	c.2849C>G	p.Ser950Cys
1147	V	<i>ITPR1</i>	AD	c.5797C>T	p.Leu1933Phe
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
57	M	<i>COL6A1</i> <i>COL1A2</i>	AD AD	c.2147C>T c.1502C>G	p.Pro716Leu p.Thr501Ser
785	V	<i>KIF1A</i>	AD	c.206C>T	p.Ser69Leu
915	M	<i>SLC2A1</i>	AD	c.672C>T	p.Ala224Ala

4.2.6. Ciliopatías

Se estudiaron 26 casos a través del panel de ciliopatías. Por sospecha clínica los pacientes se agrupaban en aquellos que presentaban sintomatología compatible con síndromes de Joubert, Meckel, Senior-Loken y Bardet-Biedl. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 38,46%, detectando en 10 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 26). En 3 casos (11,54%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 27) y en 13 de los 26 (69,12%) no se identificó la causa genética.

En 5 pacientes fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados al síndrome de Bardet-Biedl: variantes heterocigotas compuestas fueron detectadas en los pacientes 225 y 688, en el gen *BBS10*; variantes homocigotas fueron identificadas en 3 pacientes: paciente 298 en el gen *BBS12*, paciente 339 en el gen *BBS1* y el paciente 828 en el gen *BBS7*.

En 4 pacientes fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados al síndrome de Bardet-Biedl: variantes heterocigotas compuestas en los pacientes 134 y 355, en los genes *CPLANE1* y *CEP290*, respectivamente. En el paciente 570, fue detectada la presencia de una variante homocigota en el gen *CSPP1*. En el paciente 583 fue identificada una CNV, una delección del exón 15 del gen *TTC8*.

En el paciente 208 fue identificada una variante homocigota en el gen *WDR19* asociado al síndrome Senior-Loken.

Tabla 26_Panel de Ciliopatías - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
134	V	<i>CPLANE1</i>	AR	c.[493del]; [3379T>G]	p.[Iso165Tyrfs]; [Ser1127Ala]
208	M	<i>WDR19</i>	AR	c.[3533G>A]; [3533G>A]	p.[Arg1178Gln];[Arg 1178Gln]
225	M	<i>BBS10</i>	AR	c.[1677delC]; [989T>G]	p.[Tyr559*]; [Val330Gly]
298	M	<i>BBS12</i>	AR	c.[65T>C]; [65T>C]	p.[Phe22Ser]; [Phe22Ser]
339	M	<i>BBS1</i>	AR	c.[118delT]; [118delT]	p.[Cys40fs*1]; [Cys40fs*1]
355	V	<i>CEP290</i>	AR	c.[4028delA]; [1512_1515del] c.[2364_2365del];	p.[Lys1343fs*1]; [Arg504fs*8]
570	M	<i>CSPP1</i>	AR	[2364_2365del]	p.[Lys789Argfs*9]; [Lys789Argfs*9]
583	M	<i>TTC8</i>	AR	g.(?_89343613)_ (89343804_?)del	-
688	V	<i>BBS10</i>	AR	c.[1272delA(; 271dupT]	p.[Leu424fSer]; [Cys91Leufs*5]

828	M	BBS7	AR	c.712_715delAG AG	p.Arg238fs
-----	---	------	----	----------------------	------------

En 3 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 5 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos, los casos 119 y 439, las variantes fueron heredadas de la madre y en el caso 678, heredada del padre. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas en genes asociados a patologías de herencia recesiva con clínica compatible.

Tabla 27_Panel de Ciliopatías - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
838	V	WDR19	AR	c.[1477G>C(;) 2421G>T]	p.[Asp493His]; [Lys807Asn]
949	M	LZTR1	AD	c.1353+1G>A	-
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gene	H	Variante	Proteína
812	V	OFD1	XLR	c.2305A>G	p.Arg769Gly

4.2.7. Patrones de herencia asociados a los ECM y Enfermedades Neurológicas

Se analizó el patrón de herencia asociado a los genes donde fueron identificadas variantes patogénicas/posiblemente patogénicas y variantes de significado incierto, en los casos donde el diagnóstico fue considerado positivo y no concluyente (figura 8).

En 61 genes asociados a enfermedades metabólicas, 85% (52/61) presentaban un patrón de herencia recesiva. Cerca del 5% de los genes

(3/61) eran autosómicos dominantes y el 3% (2/61) podrían presentar herencia dominante o recesiva. Un 7% (4/61) de los genes estaban ligados al cromosoma X.

En 111 genes asociados a enfermedades neurológicas, 37% (41/111) presentaban herencia recesiva, mayoritariamente localizados en los paneles de enfermedades neuromusculares y ciliopatías, y el 41% (45/111) seguían un patrón autosómico dominante, donde la mayoría de los genes estaban localizados en el panel de epilepsias, defectos de la morfogénesis cerebral y discapacidad intelectual. El 9% (10/111) presentaban herencia dominante o recesiva y el 14% (15/111) seguían un patrón de herencia ligada al X.

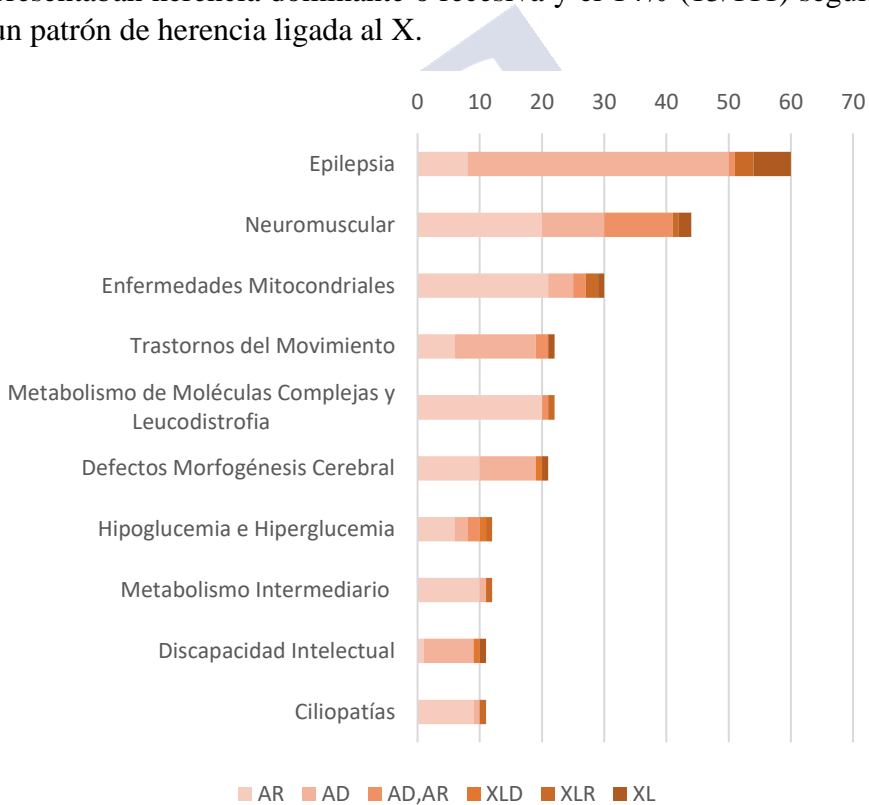


FIGURA 8 - PATRÓN DE HERENCIA ASOCIADO A LOS GENES DONDE FUERON IDENTIFICADAS VARIANTES PATOGENICAS/POSIBLEMENTE PATOGENICAS Y VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO, EN LOS CASOS DONDE EL

DIAGNÓSTICO FUE CONSIDERADO POSITIVO Y NO CONCLUYENTE. AD: *autosómico dominante*; AR: *autosómica recesiva*; XL: *ligada al cromosoma X*.

4.3. NEUROEXOMA

En el panel del NeuroExoma se incluyeron todos los genes (~1929 genes) asociados a enfermedades metabólicas y neurológicas incluidos en los paneles individuales previamente descritos. Se estudiaron 37 nuevos casos a través del panel de NeuroExoma.

Panel	Diagnosticados		No Concluyentes		Negativos	
	N	%	N	%	N	%
NeuroExoma	9	24,32	15	40,54	13	35,14

TABLA 28 - NÚMERO (N) Y PORCENTAJE DE CASOS ESTUDIADOS CON DIAGNÓSTICO POSITIVO, NO CONCLUYENTE O NEGATIVO EN EL NEUROEXOMA.

Se obtuvo una tasa diagnóstica del 24,32%, detectando en 9 pacientes la causa molecular de su patología (tabla 29). En 15 casos (40,54%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla 30) y en 13 de los 37 (35,14%) no se identificó la causa genética.

En 3 pacientes con sospecha de enfermedad neuromuscular fueron detectadas variantes patogénicas heterocigotas. En 2 de ellos se confirmó que las variantes eran *de novo*: en el paciente 1134 en el gen *DYNC1H1*, asociado la discapacidad intelectual tipo 13, y en el paciente 1209 en *COL6A1*, asociado a la distrofia muscular de Ullrich. En el paciente 1010 fue detectada una variante heterocigota en el gen *ACTA1*, asociado a miopatía congénita. El estudio familiar del paciente 1010 no fue concluyente porque sólo se pudo determinar la ausencia de la variante en el padre. Al ser fruto de un proceso de fecundación *in vitro* a partir de un ovulo donado no fue posible confirmar la herencia materna. Sin embargo, la sospecha clínica quedó confirmada por test genético y por biopsia muscular.

En 2 pacientes con sospecha de enfermedad epiléptica fueron identificadas variantes heterocigotas. En el paciente 1085 en el gen *KCNQ2* asociado a la encefalopatía epiléptica y en el paciente 153, en *GRIN2A* asociado a la epilepsia focal. En este último caso, la variante no fue identificada en los progenitores, pero sí en la hermana afectada del paciente 153, confirmando un posible mosaicismo.

En 2 pacientes con sospecha de defectos en la morfogénesis cerebral se identificaron variantes heterocigotas *de novo*. En el paciente 696, en el gen *NEDD4L*, asociado a la heterotropía periventricular nodular; en el paciente 958 en el gen *MED17* asociado a la microcefalia postnatal progresiva.

En 2 pacientes con sospecha diagnóstica indefinida fueron identificadas variantes patogénicas: una variante homocigota en el paciente 978 en el gen *TMEM70*, asociado a la deficiencia del complejo V mitocondrial, y una variante *de novo* en el paciente 1055 en *PTPN11* asociado al síndrome de Noonan.

Tabla 29_NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
153	V	<i>GRIN2A</i>	AD	c.1928C>A	p.Ala643Asp
696	M	<i>NEDD4L</i>	AD	c.2153T>C	p.Met718Thr
958	V	<i>MED17</i>	AD	c.[1927A>G]; [386delC	p.[Met643Val]; [Pro129Leufs*18]
978	M	<i>TMEM70</i>	AR	c.317-2A>G	-
1010	M	<i>ACTA1</i>	AD	c.614C>A	p.Thr205Lys
1055	V	<i>PTPN11</i>	AD	c.1391G>C	p.Gly464Ala
1085	V	<i>KCNQ2</i>	AD	c.1658G>A	p.Arg553Gln
1134	V	<i>DYNC1H1</i>	AD	c.10354G>A	p.Ala3452Thr
1209	V	<i>COL6A1</i>	AD	c.850G>A	p.Gly284Arg

En 15 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 8 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 6 casos fueron

identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores asintomáticos. En 1 caso fue identificada una variante heterocigota en un gen asociado a patología de herencia recesiva con clínica compatible.

Tabla 30_NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

○ Por falta de estudio familiar					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
999	V	SLC6A1	AD	c.1157_1159delTCT	-
1015	V	CACNA1D	AD	c.2979-1G>C	-
1021	V	LMNB1	AD	c.1025_1026delAA	p.(Lys342Argfs*17)
1136	V	CHD1	AD	c.4289A>G	p.Gln1430Arg
1192	V	EPB41L1	AD	g.(?_34785756)_ (34785988_?)del	-
1199	V	TPM2	AD	c.635A>G	p.Glu212Gly
1214	V	STXBP1	AD	c.875G>A	p.Arg292His
1215	M	CDK5RAP2	AR	c.1245G>T(;) 1246delG	p.Arg415Ser(;) Glu416ArgfsTer35)
○ Variante heredada de uno de los progenitores					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
997	V	HIVEP2	AD	c.7289C>A	p.Ser2430*
1013	V	TALDO1	AR	c.[656A>G; 181C>G]	p.[Lys219Arg; Leu61Val]
1101	M	PURA	AD	c.907_909dup CAG	p.Gln303dup
1158	V	SCN8A	AD	c.2389A>G	p.Thr797Ala
1170	M	PPP2R1A	AD	c.1013A>G	p.Asn338Ser
1223	M	NALCN	AD	c.2507C>G	p.Pro836Arg
○ Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible					
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína
932	M	ARFGF2	AR	c.1419G>T	p.Gln473His

4.4. REANÁLISIS POR NEUROEXOMA DE PACIENTES CON RESULTADO GENÉTICO PREVIO NEGATIVO

De los 420 casos analizados por panel genético individual y con resultado de diagnóstico negativo, 81 de ellos fueron estudiados posteriormente por el panel NeuroExoma. Se obtuvo una tasa diagnóstica del 33,33%, detectando en 27 pacientes la causa molecular de su patología (tabla X). En 16 casos (19,75%) el diagnóstico no fue concluyente (tabla X) y en 38 de los 81 (46,91%) no se identificó la causa genética. Los resultados de esta reanálisis se presentan a continuación:

4.4.1. Pacientes con sospecha clínica inicial de enfermedad mitocondrial

En 42 pacientes que habían sido analizados previamente por el panel de enfermedades mitocondriales y que obtuvieron un resultado negativo, se volvieron a estudiar por el panel de NeuroExoma. En 13 de los 42 pacientes con una sospecha clínica inicial de enfermedad mitocondrial fue posible identificar el defecto molecular: En 11 pacientes, se verificó que el gen causal de su patología estaría incluido en un panel distinto al de enfermedades mitocondriales y en 2 pacientes el gen causal fue incluido posteriormente en el panel de enfermedades mitocondriales debido a las actualizaciones periódicas de su contenido (Tabla 31). En 6 de los 42 casos no se pudo obtener un diagnóstico concluyente (Tabla 32).

En 11 pacientes, se verificó que el gen causal de su patología estaría incluido en un panel distinto al de mitocondrial. En 5 pacientes fueron detectadas variantes heterocigotas patogénicas en genes asociados a la epilepsia (EPI, tabla 31): paciente 41 en el gen *KCNT1*, pacientes 317 y 684 en el gen *GNAO1*, y en los pacientes 571 y 704 en el gen *KCNQ2*. En 2 pacientes fueron detectadas variantes heterocigotas patogénicas en genes asociados a la discapacidad intelectual (DISC INT, tabla 31): paciente 315 en el gen *SLC16A2*

(incluido además en el panel de enfermedades neuromusculares, MUS, tabla 31), y paciente 912 en el gen *STAG1* (incluido también en el panel de Defectos de la Morfogénesis Cerebral, MORF CER, tabla 31). En 2 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas en genes asociados con otras patologías tales como el gen *ALMS1*, en el paciente 499 y asociado al síndrome de Alstrom, incluido en el panel de hipo/hiperglucemia (HIPO/HIPER, tabla 31) por la presentación clínica asociada a estas características; y el gen *POLR3A*, asociado a la leucodistrofia hipomielinizante en el paciente 906, incluido en el panel de metabolismo de moléculas complejas y Leucodistrofias (MOL COM, tabla 31).

En 2 pacientes fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas en genes que fueron incluidos posteriormente en el diseño individual del panel de enfermedades mitocondriales (MITO, tabla 31): paciente 393 en el gen *LIPT1*, y paciente 1082 en el gen *LRPPRC*.

Tabla 31_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Pacientes con sospecha inicial de enfermedad mitocondrial						
Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
41	V	<i>KCNT1</i>	AD	c.[785G>A]; [3503-1G>A]	p.[Arg262Gln] ; [-]	EPI
315	V	<i>SLC16A2</i>	XLD	c.99dupT	p.(Glu34*)	MUS DISC INT
317	M	<i>GNAO1</i>	AD	c.607G>A	p.Gly203Arg	EPI
351	V	<i>SBF2</i>	AR	c.[2380G>T]; [2380G>T]	p.[Ala794Ser]; [Ala794Ser]	MUS
393	V	<i>LIPT1</i>	AR	c.[212C>T]; [292C>T]	p.[Ser71Phe]; [Arg98Trp]	MITO
499	V	<i>ALMS1</i>	AR	c.[7586C>G]; [11017C>T]	p.[Ser2529*]; [Gln3673*]	HIPO/ HIPER
571	V	<i>KCNQ2</i>	AD	c.629G>A	p.Arg210His	EPI
684	M	<i>GNAO1</i>	AD	c.709G>A	p.Glu237Lys	EPI
704	M	<i>KCNQ2</i>	AD	c.833T>C	p.Ile278Thr	EPI
774	V	<i>FLVCR1</i>	AR	c.[721G>A]; [721G>A]	p.[Ala241Thr]; [Ala241Thr]	MOV

906	V	POLR3A	AR	c.[2248-1G>C]; [1771-7C>G]	-	MOL COMP
912	M	STAG1	AD	c.2285T>A	p.Leu762*	DISC INT MORF CER
1082	M	LRPPRC	AR	c.[1678A>T]; [1736-7T>G]	p.[Ile560Leu]; [-]	MITO

Tabla 31 - EPI - Epilepsia; MITO - Mitocondrial; MUS - Neuromuscular; DISC INT - Discapacidad Intelectual; MORF CER - Morfogénesis cerebral; MOV - Trastornos del movimiento; MOL COMP - Moléculas complejas; MET INT - Metabolismo Intermediario; HIPO/HIPER - Hipo/Hiper glucemia.

En 6 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 4 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 1 caso fue identificada una variante heterocigota heredada de la madre, en la paciente 1081. En el caso 42 fue identificada una variante heterocigota en el gen *MTO1* asociado a la deficiencia de la fosforilación oxidativa, de herencia recesiva y con clínica compatible.

Tabla 32_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Pacientes con sospecha inicial de enfermedad mitocondrial

○ Por falta de estudio familiar

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
151	V	ZEB2	AD	c.3202_3207 delGGCTCG	p.Gly1068_Ser1069del	EPI
253	V	ZNF41	XL	c.2057T>C	p.Phe686Ser	DISC INT
278	V	ARID1B	AD	c.2281+1G>C		DISC INT
705	V	SLC6A1	AD	c.1045A>G	p.Thr349Ala	EPI

○ Variante heredada de uno de los progenitores

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
1081	M	BSCL2	AD	c.40C>A	p.Gln14Lys	DISC INT

- Variante heterocigota en gen recesivo con clínica compatible

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
42	V	<i>MT01</i>	AR	c.1390C>T	p.Arg464Cys	<i>MITO</i>

4.4.2. Pacientes con sospecha clínica inicial de Epilepsia

En 26 pacientes que habían sido analizados previamente por el panel de epilepsia y que obtuvieron un resultado negativo, se volvieron a estudiar por el panel de NeuroExoma. En 11 de los 26 pacientes con una sospecha clínica inicial de epilepsia fue posible identificar el defecto molecular.

En 5 pacientes fueron identificadas variantes patogénicas en genes que fueron incluidos posteriormente en el diseño individual del panel de epilepsia (EPI, tabla 33).

En 6 pacientes, se verificó que el gen causal de su patología estaría incluido en un panel distinto al de epilepsia. En 2 pacientes fueron detectadas variantes heterocigotas en genes asociados a defectos en la morfogénesis cerebral (MORF CER, tabla 33). En 4 pacientes fueron identificadas: variantes heterocigotas compuestas en los pacientes 38, en el gen *PCCA*, incluido en el panel de defectos de metabolismo intermediario (MET INT, tabla 33); variantes homocigotas fueron identificadas en los pacientes 991, en el gen *ATPAF2* incluido en el panel de enfermedades mitocondriales (MITO, tabla 33) y en el gen *NAGS* incluido en el panel de metabolismo intermediario (MET INT, tabla 33); y en el paciente 1024, en el gen *HEXA* incluido en el panel del metabolismo de moléculas complejas y Leucodistrofias (MOL COM, tabla 33).

Tabla 33_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Pacientes con sospecha inicial de epilepsia

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Resultado final
38	V	PCCA	AR	c.[469-4A>G]; [929C>G]	p.[-]; [Ala310Gly]	MET INT
67	V	SLC13A5	AR	c.[1511delT]; [1514C>T]	p.[Leu504fs]; [Pro505Leu]	EPI
76	V	SYNGAP1	AD	c.1264G>T	p.Glu422*	MORF CER
109	V	KCNB1	AD	c.1107G>C	p.Trp369Cys	EPI
164	V	SLC9A6	XLD	c.1601C>G	p.Ser534*	DISC INT
201	M	DNM1	AD	c.112G>A	p.Gly38Ser	EPI
289	V	CSNK2B	AD	c.124C>T	p.Gln42*	EPI
363	M	TSC2	AD	c.3637G>A	p.Glu1213Lys	MORF CER
991	M	ATPAF2 NAGS	AR AR	c.[133+1G>T]; [133+1G>T]; c.[715G>A]; [. [715G>A]]	- p.[Val239Ile]; [Val239Ile]	MITO MET INT
1024	V	HEXA	AR	c.[533G>A]; [533G>A]	p.[Arg178His]; [Arg178His]	MOL COM
1156	M	SLC6A1	AD	c.1153T>C	p.Phe385Leu	EPI

En 7 de los 26 casos no fue posible obtener un diagnóstico molecular concluyente. En 4 casos, por no disponer de muestras de los progenitores, no fue posible concluir los estudios familiares para determinar la segregación las variantes identificadas. En 3 casos fueron identificadas variantes heterocigotas heredadas de uno de los progenitores.

Tabla 34_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente**Pacientes con sospecha inicial de enfermedad epilepsia**

○ Por falta de estudio familiar

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
126	M	<i>GFM2</i>	AR	c.[1925A>C]; [1922T>A]	p.[Glu642Ala]; [Phe641Tyr]	MITO
203	M	<i>PDHA1</i>	XL	c.577_578del TT	p.Leu193fs	MITO
535	M	<i>ATP13A2</i>	AR	c.[313G>A]; [746C>T]	p.[Val105Ile]; [Ala249Val]	MOV
1041	M	<i>ALG1</i>	AR	c.826C>T	p.Arg276Trp	MUS

○ Variante heredada de uno de los progenitores

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
1084	V	<i>MTOR</i>	AD	c.126G>T	p.Lys42Asn	MORF CER
150	M	<i>KCNQ2</i> <i>SCN3A</i>	AD AD	c.2240C>T c.5813T>C	p.Ala747Val p.Leu1938Ser	- EPI
204	M	<i>HCN1</i>	AD	c.130G>C	p.Gly44Arg	MITO

4.4.3. Pacientes con sospecha clínica inicial de defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias

En 5 pacientes que habían sido analizados previamente por el panel de Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias y que obtuvieron un resultado negativo, se volvieron a estudiar por el panel de NeuroExoma. Sin embargo, en 2 casos fueron identificadas variantes probablemente patogénicas cuyo diagnóstico no es concluyente por no disponer de muestras de los progenitores. En la paciente 374, una variante heterocigota en el gen *COL4A1*, incluido en el panel de defectos de la morfogénesis cerebral (MORF CER, tabla 35); y en el paciente 391, fueron identificadas 2 CNVs en *ATAD3C* incluido en el panel de enfermedades mitocondriales (MITO, tabla 35).

Tabla 35_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Pacientes con sospecha inicial de leucodistrofia

○ Por falta de estudio familiar

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
374	M	COL4A1	AD	c.2906G>A	p.Gly969Glu	MORF CER
391	M	ATAD3C	-	g.(?_1386013)_(1391321_?)del g.(?_1396105)_(1403960_?)del		MITO

4.4.4. Pacientes con sospecha clínica inicial de Defectos de la Morfogénesis Cerebral

En 3 pacientes que habían sido analizados previamente por el panel de defectos de la morfogénesis cerebral y que obtuvieron un resultado negativo, se volvieron a estudiar por el panel de NeuroExoma. En 2 de los 3 pacientes fue posible identificar el defecto molecular: en el paciente 165, una variante heterocigota *de novo* en el gen *TCF4* incluido en el panel de epilepsia y asociado al síndrome de Pitt-Hopkins (EPI, tabla 36); en la paciente 990 variantes heterocigotas compuestas fueron identificadas en el gen *PRKRA*, incluido en el panel de trastornos del movimiento (MOV, tabla 36).

Tabla 36_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Pacientes con sospecha inicial de defectos de la morfogénesis cerebral

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
165	V	TCF4	AD	c.2011C>T	p.Arg671Trp	EPI

990	M	PRKRA	AR	c. [457C>T] ; [665C>T]	p.[Pro153Ser]; [Pro222Leu]	MOV
-----	---	-------	----	---------------------------	-------------------------------	-----

4.4.5. Pacientes con sospecha clínica inicial de Ataxia y Trastornos del Movimiento

En 1 paciente que había sido analizado previamente por el panel de ataxias y trastornos del movimiento y que obtuvo un resultado negativo, se volvió a estudiar por el panel de NeuroExoma. En el paciente 392, se ha identificado una variante *de novo*, heterocigota y posiblemente patogénica en el gen *GNAO1* asociado a la encefalopatía epiléptica e incluido en el panel de epilepsia.

Tabla 37_Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Pacientes con sospecha inicial de ataxia y trastornos del movimiento

Paciente	Sexo	Gen	H	Variante	Proteína	Panel asociado
392	V	GNAO1	AD	c.723+2T>A	-	EPI

4.5. RESULTADOS GLOBALES

4.5.1. Tasas de diagnóstico global por Panel Individual y NeuroExoma

Los resultados de este estudio muestran que los 4 paneles con mayor tasa de diagnóstico son: el de Metabolismo Intermediario (58,33%), Ciliopatías (38,46%), Neuromuscular (36,90%) y Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias (36.5%). El mayor porcentaje de casos de diagnóstico negativo se acumula en los paneles de Enfermedades Mitocondriales (73,24%), Discapacidad

Intelectual (71,43%) y Trastornos del Movimiento (69,12%). Con relación a los diagnósticos no concluyentes, si el panel de Neuromuscular era el que presentaba una de las mayores tasas de diagnóstico positivo, en él también se refleja el mayor porcentaje de diagnósticos por confirmar (32,14%), seguido del panel de Epilepsia (30,09%) (Figura 9).

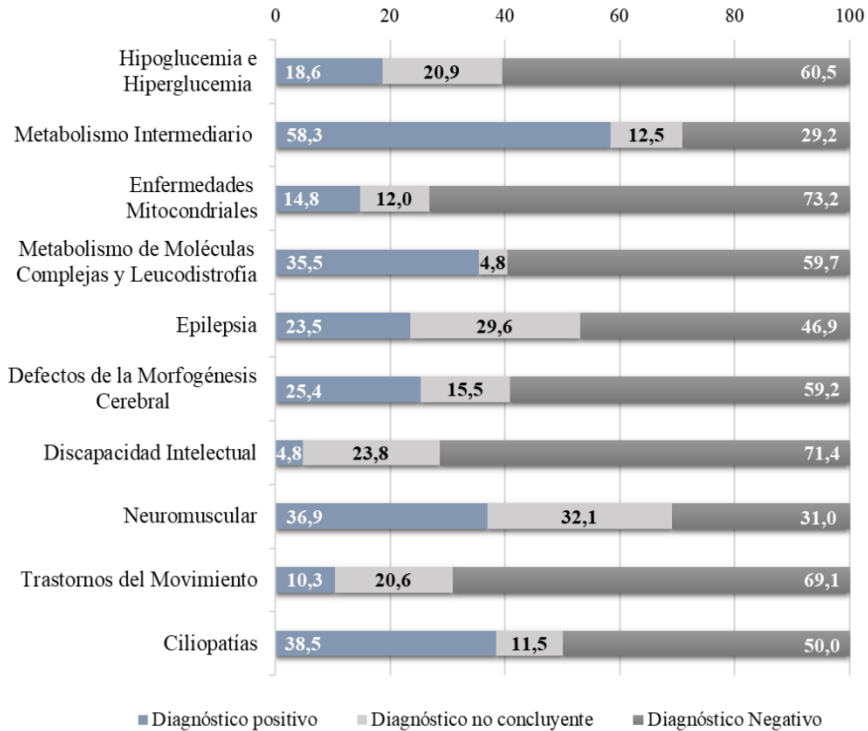


FIGURA 9 - TASAS DE DIAGNÓSTICO DE CADA PANEL GENÉTICO.

4.5.2. Variantes Identificadas

En los casos con diagnóstico positivo, fueron identificadas en total 247 variantes patogénicas/posiblemente patogénicas y 12 variantes de significado incierto, pero que al estar presentes con una variante patogénica/posiblemente patogénica en un gen de herencia recesiva, están incluidas en el análisis de los pacientes con diagnóstico positivo

(figura 10). En los casos no concluyentes, se identificaron 166 variantes de significado incierto y 59 P/LP, que por falta de muestras de los progenitores no fue posible concluir el estudio de portador y/o la presencia de la misma en uno de los progenitores, no confirma su patogenicidad (figura 11).

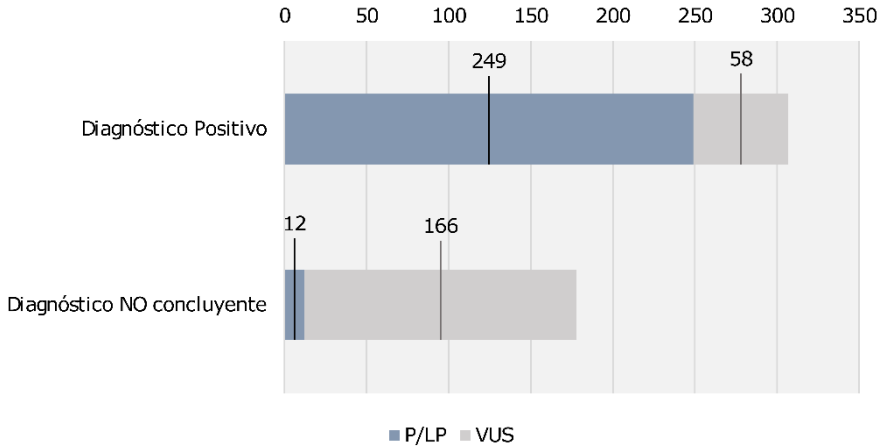


FIGURA 10 - A) NÚMERO TOTAL DE VARIANTES PATOGENICAS (P) Y/O POSIBLEMENTE PATOGENICAS (PP) EN LOS CASOS CON DIAGNÓSTICO POSITIVO Y DIAGNÓSTICO NON CONCLUYENTE.

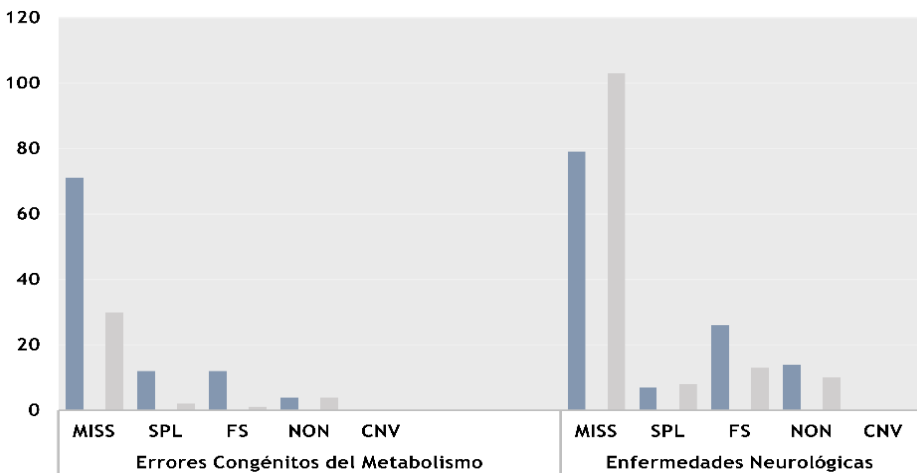


FIGURA 11 - B) PORCENTAJES DEL TIPO DE VARIANTES IDENTIFICADAS EN LOS PACIENTES ESTUDIADOS CON SOSPECHA DE ECM O DE ENFERMEDAD NEUROLÓGICA. LAS VARIANTES *MISSENSE* Y *FRAMESHIFT* FUERON LAS MÁS DESCRITAS. *MISS* - *missense*; *FS* - *Frameshift*; *SPL* - *splicing*; *NON* - *nonsense*; *CNV* - *Copy Number Variation*

4.5.3. Detección de variantes *de novo*

En este estudio se han identificado en los pacientes con diagnóstico positivo, un total de 239 variantes patogénicas o posiblemente patogénicas, de las cuales 90 (cerca de 37,66%), son *de novo*. El 93,33% (84/90) de las variantes *de novo* fueron identificadas en genes asociados a enfermedades neurológicas como la epilepsia (60%, 54/90), defectos de la morfogénesis cerebral (15,56%, 14/90), afectación neuromuscular (11,11%, 10/90), trastornos del movimiento (2,22%, 2/90) y discapacidad intelectual (4,44%, 4/90). Las demás variantes *de novo* (5,55%, 5/90) fueron identificadas en genes asociados a errores congénitos del metabolismo: mitocondriales (5,62%, 5/90) y metabolismo de moléculas complejas (1,12%, 1/90) (figura 12).

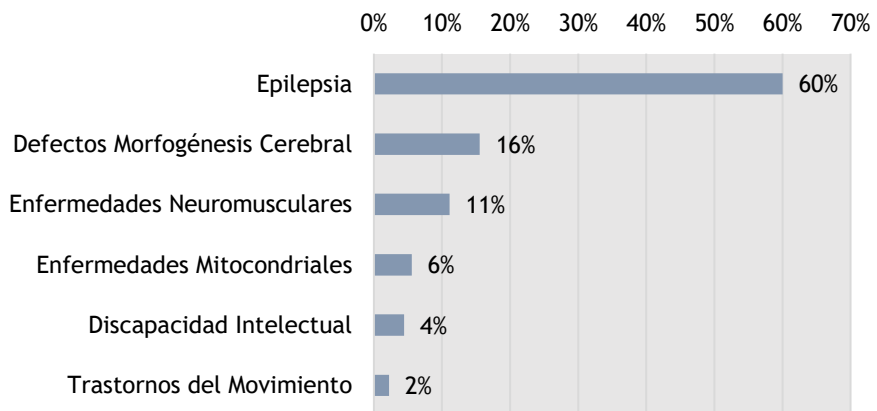


FIGURA 12 - PORCENTAJE DE VARIANTES *de novo* IDENTIFICADAS EN EL ANÁLISIS DE LOS CASOS ESTUDIADOS.

Los genes donde se ha detectado con mayor frecuencia este tipo de variantes estaban alocados en su mayoría en los paneles de epilepsia, defectos de la morfogénesis cerebral y enfermedades neuromusculares (Figura 13).



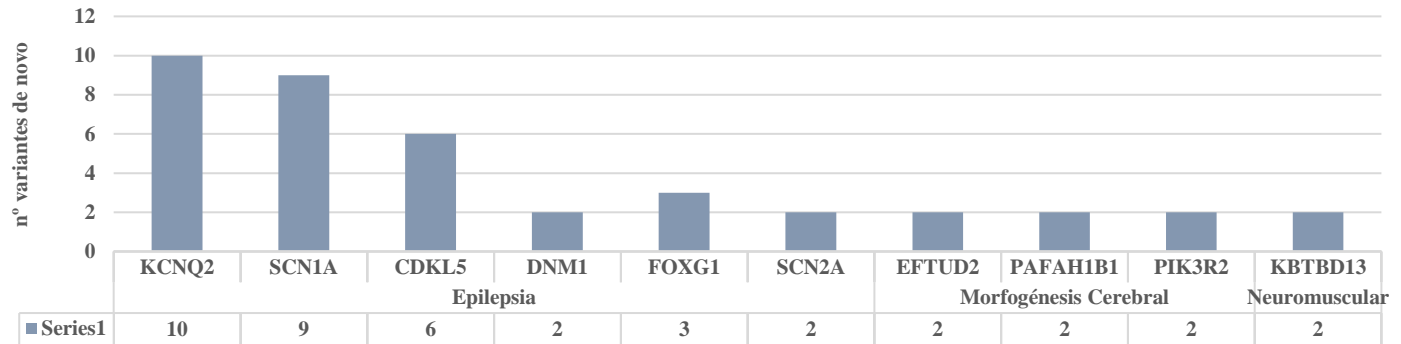


FIGURA 13 - NÚMERO DE VARIANTES *de novo* DETECTADAS EN GENES ASOCIADOS A LA EPILEPSIA, DEFECTOS DE LA MORFOGÉNESIS CEREBRAL Y ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES.

4.5.4. Detección de variantes recurrentes

En 11 casos fueron detectadas variantes recurrentes y que estarían asociadas con la clínica o alteración bioquímica presentada por el paciente (tabla 38).

Tabla 38_Variantes recurrentes identificadas en nuestra cohorte

<i>Paciente</i>	<i>Panel analizado</i>	<i>Gen</i>	<i>Variante</i>
60 1024	MOL COM NEURO	HEXA	c.533G>A
634 760	MET INT MET INT	PAH	c.782G>A
86 422	MORF CER MORF CER	PIK3R2	c.1117G>A
207 975 1129	EPI EPI EPI	PRRT2	c.649dupC
317 1208	EPI NEURO	GNAO1	c.607G>A

4.5.5. Detección de Copy Number Variation (CNVs)

En 10 pacientes fueron identificadas un total de 12 CNVs, descritas en tabla 39.

Tabla 39_CNVs identificadas en nuestra cohorte

<i>Paciente</i>	<i>Panel analizado</i>	<i>Gen</i>	<i>Tipo de CNV</i>	<i>Región afectada del gen</i>
48	MORF CERE	PAFAH1B1	DEL	E10-E11

71	EPI	SCN1A SCN2A SCN9A	DUP DUP DUP	Cluster
121	MORF CER	PAFAH1B1	DEL	E1
215	MITO	FARS2	DEL	E3
254	MET INT	TCN2	DEL	E8
282	MUS	SIGMAR1	DEL	E4
583	CILIO	TTC8	DEL	E15
1058	EPI	IL1RAPL1	DEL	E2-E8
1182	MOV	SACS	DEL	E3-E5
1203	MUS	DMD	DEL	E21-E33

4.5.6. Detección de herencia digénica

En 3 casos, fueron detectadas variantes posiblemente patogénicas en más que un gen y que podrían estar ambos asociados con el trastorno presentado por el paciente, siendo probable un solapamiento clínico por herencia digénica (tabla 40).

Tabla 40_Posibles casos de herencia digénica identificadas en nuestra cohorte

Paciente	Panel analizado	Gen
501	EPI	SLC12A5 SCN1A
968	EPI	SLC12A5 SCN1A CACNA1A
1167	HIPO/HIPER	SLC37A4 ABCC8

4.5.7. Utilidad diagnóstica: Panel Individual, NeuroExoma, Panel Individual y Reanálisis por NeuroExoma

Se compararon los porcentajes de los distintos criterios de diagnóstico (positivo, no concluyente, negativo) entre los tres tipos de análisis. El porcentaje de diagnóstico positivo entre el Panel Individual y NeuroExoma es similar, 23% y 24%, respectivamente. El análisis complementario por NeuroExoma posterior al análisis por Panel Individual presenta una tasa de diagnóstico ligeramente superior, alrededor del 32% (figura 14).

Hay más casos sin diagnosticar en los análisis por paneles individuales (55%) y cerca del 41% de los casos estudiados solamente por NeuroExoma se mantienen como no concluyentes, en su mayoría por falta de realizar los estudios de segregación familiar.

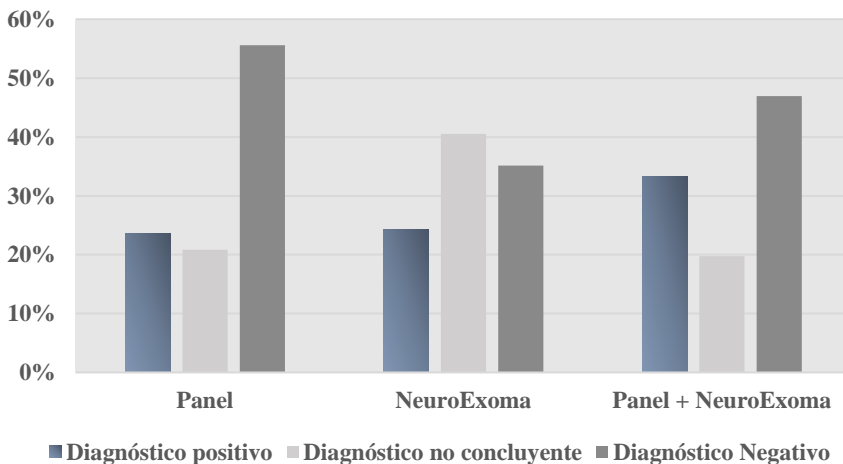


FIGURA 14 - COMPARACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO (POSITIVO, NO CONCLUYENTE, NEGATIVO) ENTRE LOS TRES TIPOS DE ESTRATEGIA DE ANÁLISIS: PANEL, NEUROEXOMA Y PANEL + NEUROEXOMA.

4.6. ESTUDIOS FUNCIONALES

4.6.1. FOXRED1: paciente 43

4.6.1.1. FOXRED1 modelo de proteína

El gen *FOXRED1* codifica una proteína de 53,8 kDa compuesta por 486 aminoácidos y que contiene el dominio oxidoreductasa dependiente de FAD. La proteína tiene una secuencia de señal mitocondrial N-terminal para que sea importada a la mitocondria ²³² y que está asociada a la matriz de la membrana interna mitocondrial ²³³. Todas las variantes identificadas hasta la actualidad se encuentran en diferentes regiones de la proteína y se muestran en la estructura de dominio de FOXRED1 (figura 15A).

La secuencia de proteína FASTA de FOXRED1 (Uniprot AC: Q96CU9; ID: FXRD1_HUMAN) se utilizó para construir un modelo de proteína generado por SwissModel.

A través de este software SWISS-MODEL (versión SMTL 2019-02-28, lanzamiento PDB 2019-02-22) se realizó una búsqueda automática usando BLAST ²³⁴ y HHBlits ²³⁵ en busca de secuencias evolutivas relacionadas que coincidan con la secuencia de FOXRED1. Al realizar este modelo de homología, se trató de determinar cómo la variante *nonsense* detectada en ambos pacientes podría afectar la estructura de la proteína, lo que probablemente conduciría a cambios conformacionales locales induciendo un impacto importante en su función. En la figura 15B, se representan las estructuras modelo para la proteína de FOXRED1 con y sin la variante c.920G> A (p.Gly307Glu).

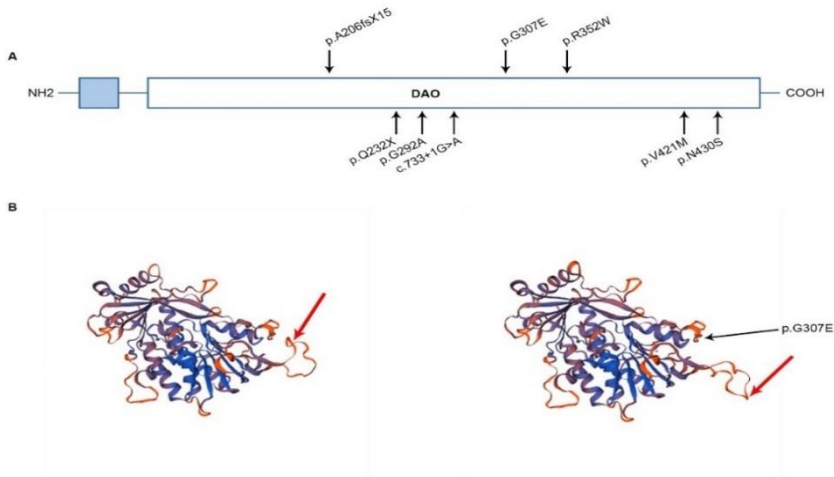


FIGURA 15 - A) ESTRUCTURA DEL DOMINIO DE FOXRED1 CON TODAS LAS VARIANTES IDENTIFICADAS EN LOS CASOS DESCRITOS. En azul claro, se muestra el péptido señal de destino mitocondrial. B) MODELO DE PROTEÍNA FOXRED1 DE TIPO SALVAJE Y MODELO DE PROTEÍNA FOXRED1 CON LA VARIANTE P.Gly307Glu, que refleja las consecuencias en la estructura espacial de la proteína debido al cambio del aminoácido no-polar glicina al ácido glutámico de carga negativa.

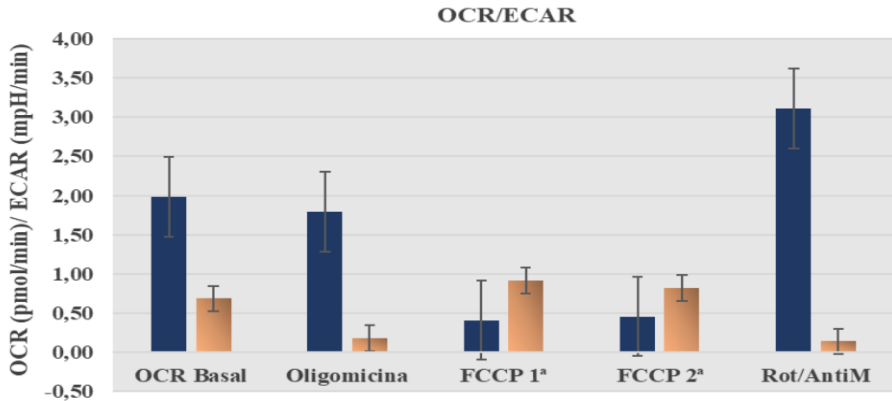
El modelo de la proteína FOXRED1 predice que la variante *missense* que induce el cambio del aminoácido no polar de la glicina al ácido glutámico con carga negativa, provoca un cambio conformacional considerable. En esta región específica del bucle de la proteína (flecha roja en la figura 10B), están presentes aminoácidos con carga positiva como la arginina y la lisina, y la metionina no polar. Los cambios en la estructura cuaternaria de FOXRED1 inducidos por la variante p.Gly307Glu podrían afectar la función de la proteína y, por lo tanto, la susceptibilidad a la enfermedad.

4.6.1.2. Respiración mitocondrial y actividad OXPHOS

Se han realizado mediciones de OCR y ECAR. Se observaron reducciones significativas tanto de OCR como de la relación OCR/ECAR en los fibroblastos del paciente 43, lo que indica un flujo

de electrones reducido a través de la cadena respiratoria (Figuras 16A y 16B). Estos resultados reflejan la deficiencia del dominio del conjunto de complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los fibroblastos del paciente.

A



B

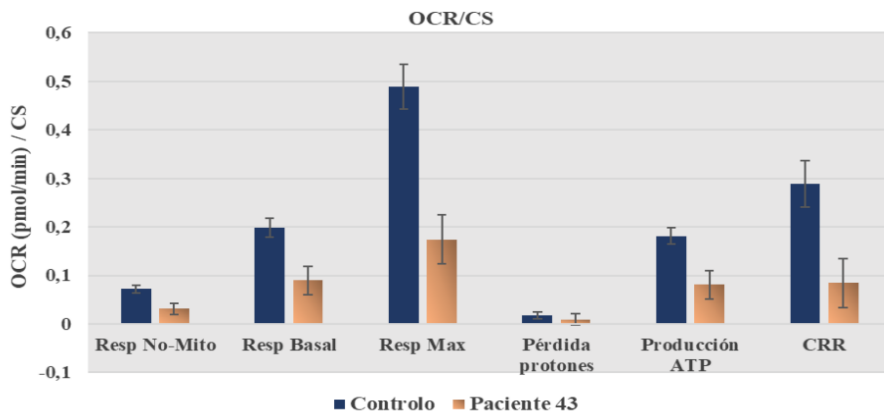


FIGURA 16 - A) EL METABOLISMO ENERGÉTICO BASAL DE CADA LÍNEA CELULAR SE EVALUÓ ANALIZANDO LAS RELACIONES OCR / ECAR A TRAVÉS DE LA ADICIÓN SECUENCIAL DE LOS INHIBIDORES Y DESACOPLANTE. B) EL OCR SE MIDIO ANTES Y DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE LOS INHIBIDORES Y DESACOPLANTE DE ETC (oligomicina, FCCP y una mezcla de rotenona y antimicina A) que se inyectaron en serie para medir la producción de ATP, la respiración máxima (Resp Max), la respiración no mitocondrial (Resp No-

Mito), fuga de protones, repuesto capacidad respiratoria (CRR) y respiración basal (Resp Basal).

El análisis por espectrofotometría de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria reveló una deficiencia del complejo I, donde se observó una reducción de alrededor de 20% en la actividad con respecto al valor más bajo del rango de referencia y de alrededor de 50% si se compara directamente contra el control con actividades normales de los complejos II, III, IV y V (tabla 41).

	Paciente 43 - Actividad (mU/U CS)	Control - Actividad (mU/U CS)	Rango de Referencia
Complejo I	134	320	163-599
Complejo II	499	582	335-888
Complejo III	843	628	570-1383
Complejo IV	482	527	288-954
Complejo V	473	712	193-819

TABLA 41 - RESULTADO DE LA MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LOS DIFERENTES COMPLEJOS DE OXPHOS EN FIBROBLASTOS DEL PACIENTE 43 Y CONTROL. CS - *Citrato sintasa*.

4.6.1.3. Análisis de inmunoblot SDS-PAGE y BN-PAGE

En la figura 17A, se muestra la presencia de la proteína FOXRED1 por SDS-PAGE. El análisis de inmunoblot de geles de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa-azul (BN-PAGE) mostró un nivel reducido del estado estacionario del complejo I en las mitocondrias de los fibroblastos del paciente (figura 17B). Se usaron diferentes concentraciones de fibroblastos de pacientes y del control, 15ug y 25ug, respectivamente, y en ambas situaciones, es evidente una deficiencia en el complejo I en el paciente 43 cuando comparado con las líneas celulares del control.

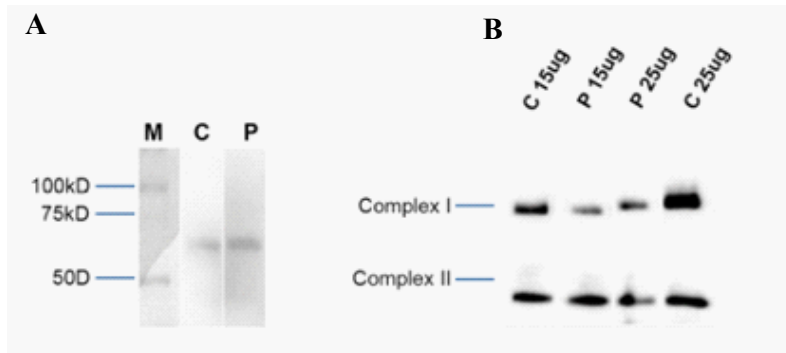


Figura 17 - A) IMMUNOBLLOT SDS-PAGE de FOXRED1 en control y fibroblastos de pacientes, FOXRED1 migró a su tamaño previsto de 54kDa. (M) Marcador, (C) Control, (P) Paciente 43 B) ANÁLISIS BN-PAGE del complejo I y la inmunodetección de transferencia Western que muestra diferencias en la cantidad del complejo I entre el control (C) y los fibroblastos del paciente 43 (P).

4.6.2. EARS2: paciente 163 y paciente 362

En el paciente 163 fueron identificadas una variante de *splicing* en homocigosis en el gen *AGK*, asociado al síndrome de Sengers, y dos variantes probablemente patogénicas en el gen *EARS2*. En el paciente 362 fueron identificadas dos variantes heterocigotas compuestas en el gen *EARS2*. Para determinar la posible patogenicidad de las variantes detectadas en *EARS2* se realizaron estudios funcionales, cuyos resultados se describen a continuación.

4.6.2.1. Respiración mitocondrial y actividad OXPHOS

Se han realizado mediciones de OCR y ECAR. De modo similar al paciente 43, también se observaron reducciones ligeras tanto de OCR como de la ratio OCR/ECAR en los fibroblastos de ambos pacientes 163 y 362, llevando a concluir que se traduce en un flujo reducido de

electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial (Figuras 18A y 18B).

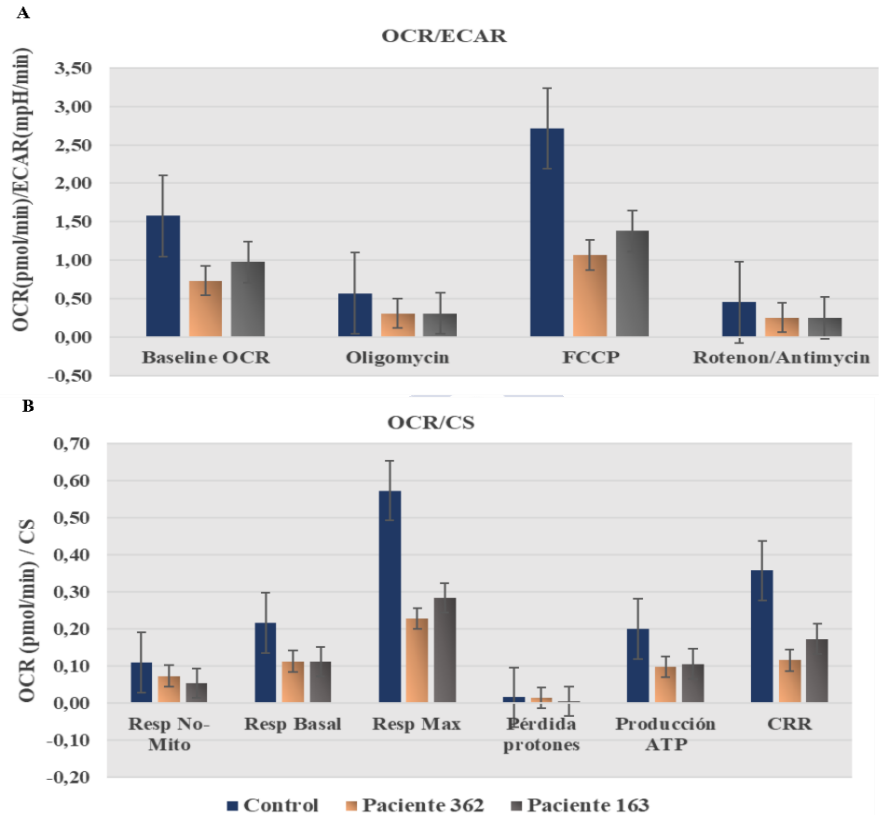


FIGURA 18 - A) Y B) ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE LA ENERGÍA BASAL DE CADA LÍNEA CELULAR ANALIZANDO LAS RELACIONES OCR / ECAR Y CONSUMO DE OCR. AMBOS PACIENTES MUESTRAN DISMINUCIONES SIGNIFICATIVAS.

El análisis espectrofotométrico de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria reveló una ligera deficiencia del Complejo III en el paciente 362 y una deficiencia significativa en el paciente 163 (Tabla 42).

	Paciente 362 - Actividad (mU/U CS)	Paciente 163 - Actividad (mU/U CS)	Control - Actividad (mU/U CS)	Rango de Referencia
Complejo I	400	253	320	163-599
Complejo II	667	433	582	335-888
Complejo III	558	462	628	570-1383
Complejo IV	456	520	527	288-954
Complejo V	883	760	712	193-819

TABLA 42 - RESULTADO DE LA MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LOS DIFERENTES COMPLEJOS DE OXPHOS EN FIBROBLASTOS DE LOS PACIENTES 163 Y 362 Y CONTROL. CS - *Citrato sintasa*.

4.6.3. Transfección y transducción viral: pLenti6.2 V5

Previamente a la transfección de los fibroblastos de los pacientes, se han creado en líneas celulares diferentes, vectores de expresión asociados a los genes *FOXRED1* y *EARS2* en *Escherichia coli*. La inserción correcta de la secuencia del gen en el cDNA correspondiente fue confirmada por PCR.

1. Transfección de las células HEK293T con pLenti-V5

La producción del lentivirus, pLenti-V5, se ha iniciado mediante la co-transfección de una solución previamente preparada de empaquetamiento de DNA y el plásmido de expresión Lenti en células HEK293T. Empleando el test Lenti-X GoStix se ha confirmado la presencia del pLenti-V5 en los fibroblastos de las muestras control y de los pacientes mediante resultado positivo.

2. Transducción de los fibroblastos de los pacientes con pLenti-V5

Una vez transfectados los fibroblastos de la muestra control y de los pacientes 43, 163 y 362 con del pLentiV5, las líneas estuvieron en cultivo por un periodo de 6-8 semanas. Posteriormente se han usado

para mediciones de OCR y ECAR. Los resultados de este análisis se presentan a continuación.

4.6.3.1.1. *Resultados rescate expresión génica de FOXRED1 y EARS2 por complementación con p-lenti V5*

En el paciente 43 transfectado con pLentiV5+FOXRED1, se ha medido el metabolismo de energía basal de la muestra, sin embargo, los resultados obtenidos fueron no concluyentes. El OCR medido seguía reducido con respecto a la muestra control (figura 19). De este modo, se concluye que no se ha logrado con éxito el rescate de expresión del gen *FOXRED1* en los fibroblastos del paciente 43.

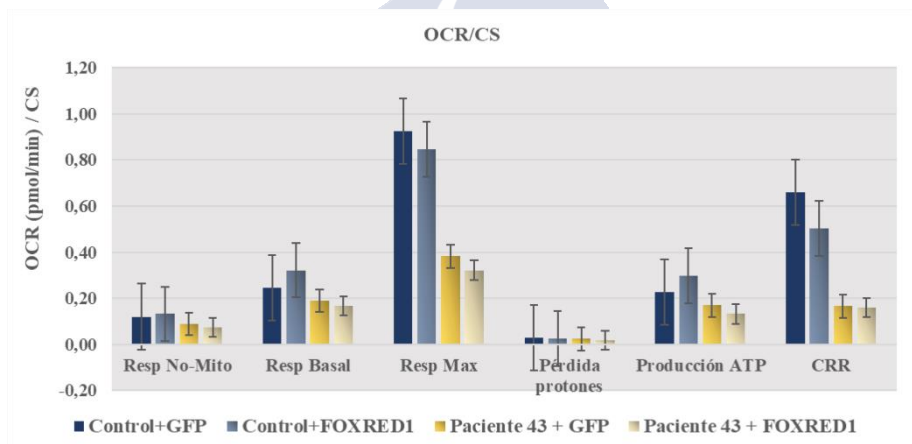


FIGURA 19 - ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE LA ENERGÍA BASAL DE CADA LÍNEA CELULAR TRANSFECTADA CON pLENTIV5, ANALIZANDO EL CONSUMO DE OCR. EL OCR MEDIDO EN EL PACIENTE 43+FOXRED1, SE MANTIENE REDUCIDO CON RESPECTO A LA MUESTRA CONTROL.

En el paciente 163, transfectado con pLentiV5+EARS, no se ha detectado ninguna mejoría en el metabolismo de energía basal de la muestra (figura 15A). El OCR medido en el paciente 163+pLentiV5, seguía reducido con respecto a la muestra control (figura 15B). De este

modo, se concluye que no se ha logrado con éxito el rescate de expresión del gen *EARS2* en los fibroblastos del paciente 163.

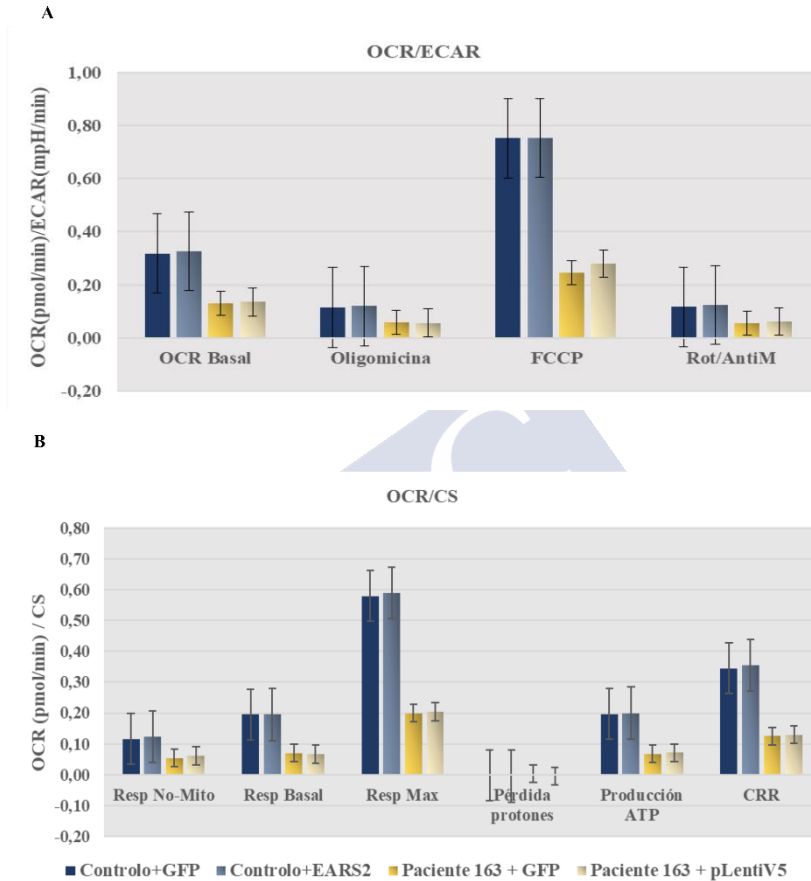


FIGURA 22 - A) Y B) ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE LA ENERGÍA BASAL DE CADA LÍNEA CELULAR TRANSFECTADA CON PLENTIV5, ANALIZANDO LAS RELACIONES OCR / ECAR Y CONSUMO DE OCR.

En el paciente 362, transfectado con pLentiV5+EARS2, no se ha logrado resultados claros en el análisis del metabolismo de la energía basal de la línea celular del paciente y por lo tanto, no se consiguió el rescate de expresión del gen *EARS2*

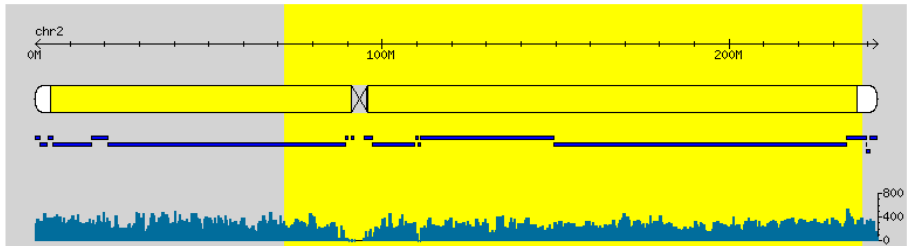
4.7. ISODISOMIA MATERNAL en TTN – PACIENTE GR146

Durante el estudio del paciente GR146, analizado por el panel de enfermedades neuromusculares, fue identificada la delección c.38661_38665del, en homocigosis, en el gen *TTN*. Esta ha sido heredada de la madre del paciente, identificada como GR146M, la cual es portadora en heterocigosis de dicha variante. La situación de homocigosis en el paciente viene provocada por un caso de isodisomía materna del cromosoma 2. Esto quiere decir que el paciente presenta uno de los dos cromosomas 2 de la madre por duplicado y no tiene copia paterna. Esto seguramente es consecuencia de un rescate monosómico.

Esto ha sido comprobado mediante diferentes análisis que se describen a continuación:

- La PCR *alelo específica* demostró que el padre no amplificaba para el alelo mutado mientras que la madre amplificaba tanto el mutado como el salvaje:
- La PCR específica para el exón 197 (quiere decir que amplificaba específicamente este exón frente a las otras dos copias idénticas presentes en el gen) y su secuenciación posterior demostró también la presencia de la delección en homocigosis en el paciente, en heterocigosis en la madre y su ausencia en el padre.
- La secuenciación masiva también demuestra que el paciente es homocigoto para la variante, la madre es heterocigota y la ausencia de la delección en el padre.
- La pérdida de heterocigosidad del paciente se sospecha por la identificación de 99 SNPs consecutivos en el cromosoma 2 en homocigosis que abarcan el siguiente intervalo: chr2:71747899-

238267911 (ver en la figura la zona del cromosoma que abarca la homocigosidad).



- El estado de isodisomía ha sido demostrado mediante la secuenciación masiva del mismo panel de Enfermedades Neuromusculares en los padres del paciente. Se han detectado 61 SNPs que demuestran que el paciente no ha podido heredar ningún cromosoma 2 del padre (SNPs informativos). El intervalo desde el primer SNP informativo hasta el último es el siguiente: chr2:71762232-238267911 (SNPs informativos en anexos).



5. DISCUSIÓN

Conocer la base molecular de una enfermedad nos permite entender su origen y predecir su curso, permitiéndonos adecuar la respuesta terapéutica adaptándola a cada paciente. En los siguientes apartados se discuten los resultados de esta tesis con relación al uso de la NGS en el diagnóstico de los Errores Congénitos del Metabolismo (ECM) y de las enfermedades neurológicas, señalando sus fortalezas y debilidades, y planteando a partir de estos resultados el futuro del diagnóstico genético de estas patologías.

5.1. ARQUITECTURA GENÉTICA DE LOS ERRORES CONGÉNITAS DEL METABOLISMO (ECM)

Los ECM han sido tradicionalmente considerados ejemplos paradigmáticos de enfermedad monogénica, y han servido como modelos importantes en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en este tipo de trastornos genéticos. Sin embargo, a medida que ha aumentado el conocimiento sobre la genética, los procesos celulares afectados y la historia natural de estas enfermedades, se ha ido revelando una complejidad que ha obligado al desarrollo de herramientas diagnósticas cada vez más potentes. En este sentido, la secuenciación de nueva generación (NGS) ha demostrado una enorme utilidad, al permitir mejorar el diagnóstico en este grupo de enfermedades al mismo tiempo que arrojaba luz sobre la compleja arquitectura genética de su base molecular.

La base molecular de los ECM es extremadamente heterogénea y puede involucrar cualquier tipo de defecto genético. Las variantes genéticas pueden ocurrir en las regiones codificantes o reguladoras del genoma, y variantes en diferentes genes pueden producir fenocopias al afectar a la misma ruta metabólica. La patogenicidad de un ECM se atribuye generalmente a la pérdida o ganancia de función de proteínas alteradas (generalmente una enzima o un transportador), presentando frecuentemente un patrón de herencia recesiva. En nuestra cohorte se

han identificado variantes homocigotas o heterocigotas compuesta en genes de herencia recesiva y asociados a diferentes ECM en 57 pacientes.

Se ha demostrado que la valoración clínica en combinación con la presencia de marcadores bioquímicos robustos, son una herramienta esencial en la interpretación del resultado genético, y por lo tanto, en la obtención del diagnóstico. En los casos PKU se hizo la confirmación genética y de los casos estudiados hemos detectado la presencia de una variante recurrente, c.782G>A (p.Arg261Gln), en heterocigosis compuesta, en dos pacientes no relacionados entre sí, 634 y 760. Esta variante había sido previamente estudiada en familias de ascendencia mediterránea, donde determinaron que la ubicación de la variante, en un doblete CpG en el codón 261, era consistente con una desaminación accidental como mecanismo mutagénico. Además, esta variante parece estar asociada con el haplotipo 1, el más frecuente en el locus *PAH*²³⁶. En un estudio previo fue identificada la misma variante en heterocigosis compuesta en tres pacientes italianos, no relacionados y con PKU. La clínica descrita en estos pacientes hace prever que la evolución del curso clínico esperada los portadores de esta variante sea moderada, como se ha verificado en nuestros pacientes^{237,238}.

En dos pacientes fue detectado un aumento de glicina en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo (LCR). En ambos casos fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a la encefalopatía por glicina (hiperglicinemia no cetósica). En el paciente 22, un varón fallecido a los 20 días de vida se identificaron dos variantes heterocigotas compuestas en *AMT*. La mayoría de los pacientes con alteraciones en este gen y con la forma clásica neonatal de la enfermedad debutan en los primeros días de vida con letargia, hipotonía y convulsiones mioclónicas, progresando hasta la muerte del paciente, una evolución clínica similar a la de nuestro caso²³⁹. En el paciente 59, fue identificada la variante c.2714T>G (p.Val905Gly) en homocigosis en el gen *GLDC*. Estudios funcionales han demostrado que este cambio da como resultado una enzima con muy baja actividad²⁴⁰. Dentro de

los casos estudiados en el panel de defectos en el metabolismo intermediario, en otro paciente varón que presentaba valores elevados de ácido úrico en sangre, el paciente 711, fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas, una frameshift y otra missense, en *MOCOS*, asociado a la Xantínuria Tipo II. Este paciente, un varón de 1 año de edad, presentaba además de hiperuricemia, episodios paroxísticos de agitación acompañados de movimientos de extremidades y dorsiflexión del cuello e irritabilidad. En general, la edad de inicio de esta enfermedad es muy variable, y la evolución de la patología suele ser moderada^{241,242}.

En el panel de Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias fueron estudiados varios pacientes con deficiencia enzimática previamente confirmada bioquímicamente. En 7 de ellos se han diagnosticado trastornos lisosomales: paciente 1165 con deficiencia de la enzima alfa glucosidasa ácida, con trastorno del almacenamiento de glucógeno tipo II (*GAA*), pacientes 238 y 848, con deficiencia de la enzima glucocerebrosidasa, diagnosticados de enfermedad de Gaucher (*GBA*), pacientes 228 y 922, con deficiencia en la enzima N-acetilglucosaminidasa, de mucopolisacaridosis tipo IIIB (*NAGLU*) y, pacientes 667 y 715, con deficiencia en la enzima heparán N-sulfatasa, diagnosticados con el tipo IIIA (*SGSH*). En estas patologías aunque la deficiencia enzimática ya determina el diagnóstico, se debe realizar la confirmación diagnóstica genética²⁴³.

En las enfermedades mitocondriales, trastornos que presentan generalmente un pronóstico devastador, la elevación del ácido láctico en sangre y orina es bastante frecuente como signo clínico de la enfermedad. Las mitocondrias son la fuente principal de energía celular mediante la biosíntesis de ATP a través del mecanismo de fosforilación oxidativa (OXPHOS), dependiente de la cadena transportadora de electrones, y de la oxidación de metabolitos mediante el ciclo de Krebs y la β -oxidación de ácidos grasos. Los defectos en la cadena de transporte de electrones causan una disminución en la producción de ATP. Los niveles bajos de ATP provocan un aumento de la glucólisis,

lo que conduce a una sobreproducción de piruvato. El exceso de piruvato puede así reducirse para formar lactato, provocando acidosis láctica ²⁴⁴. En 11 pacientes (pacientes 12, 43, 163, 205, 215, 235, 292, 362, 403, 825 y 889) diagnosticados de enfermedad mitocondrial asociada a genes de herencia recesiva, presentaron hiperlactacidemia, 4 de ellos fallecieron en el primer año de vida (paciente 163, 205, 235 y 889). En el paciente 163, varón recién nacido que fallece a las pocas horas, con diagnóstico prenatal de miocardiopatía dilatada, cataratas congénitas, ectásia piélica e hiperlactacidemia, fueron identificadas en el estudio genético variantes patogénicas en los genes *EARS2* y *AGK*, asociados a la deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa y al síndrome de Sengers, respectivamente. Los estudios funcionales realizados en fibroblastos de este paciente (discutidos posteriormente en esta sección), y su presentación clínica, demostraron que la enfermedad de debut era el de síndrome de Sengers, una vez que los datos clínicos son similares con otros casos descritos donde fueron identificadas variantes en *AGK* con muerte temprana de los afectados ²⁴⁵. Sin embargo, también se han reportado casos en que los pacientes pueden sobrevivir hasta la edad adulta con grados de afectaciones neurológicas variables ²⁴⁶, de esta forma no podemos excluir definitivamente la influencia de los defectos detectados en *EARS2* en el pronóstico fatal de nuestro paciente.

Para numerosas enfermedades no disponemos de biomarcadores diagnósticos. En estos casos la valoración clínica detallada es muy importante para guiar la interpretación de los resultados genéticos ²⁴⁷. En nuestra cohorte, diversos pacientes con distintos grados de afectación neurológica y motora, sin biomarcadores orientativos de diagnóstico, fueron igualmente diagnosticados mediante la identificación de variantes patogénicas en genes de herencia recesiva. En el paciente 919, estudiado por el panel de enfermedades mitocondriales, presentaba al nacimiento un cuadro de letargia, hipotonía, convulsiones y atrofia cortical y cerebelosa, y fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas en *COQ4*, asociado a la deficiencia primaria de coenzima Q10. En 2015, Brea-Calvo

describió 2 pacientes italianos, no relacionados entre sí y ambos con defectos en *COQ4*, con una presentación clínica similar a nuestro caso²⁴⁸. En 7 pacientes estudiados por el panel de defectos en el metabolismo de moléculas complejas (pacientes 60, 116, 117 y 513) y Leucodistrofias (pacientes 56, 221 y 231) el diagnóstico genético se alcanzó mediante análisis de la presentación clínica. El fenotipo que presentaban, que concordaba con cuadros clínicos ya descritos en la literatura²⁴⁹ era esencialmente de alteraciones en la neuroimagen como atrofia del cerebelo (pacientes 56 y 221) o alteración de la sustancia blanca del cerebro (paciente 231), alteraciones motoras como rigidez articular en el paciente 116, espasticidad progresiva en el paciente 117, hipotonía y distrofia en el paciente 513, y también epilepsia en el caso del paciente 60.

La mayoría de las enzimas involucradas en la degradación de las moléculas son reguladas por las concentraciones de sustrato, y la reducción de la actividad en sujetos portadores de variantes asociadas a la pérdida de función no suele producir efectos metabólicos relevantes. Sin embargo, las vías metabólicas de síntesis pueden estar estrictamente controladas para asegurar cantidades suficientes del producto y evitar una sobreproducción potencialmente dañina. Tales vías son menos estables, y las deficiencias genéticas parciales en individuos heterocigotos y en genes autosómicos dominantes tienen más probabilidades de provocar síntomas clínicos²⁵⁰.

En nuestra cohorte, en 3 pacientes se identificaron variantes *de novo* en genes asociados a un patrón de herencia dominante. En dos de ellos, las pacientes 142 y 179, estudiadas por el panel de enfermedades mitocondriales, resultaron portadoras de variantes heterocigotas en los genes *DNM1L* y *OPA1*, respectivamente. En el primer caso, el gen *DNM1L*, codifica un miembro de la familia de dinaminas de GTP y regula la división mitocondrial y peroxisomal. Esta proteína está involucrada en la regulación de la apoptosis y necrosis y su deficiencia ha sido asociada a la encefalopatía letal, por defectos en la fisión mitocondrial y peroxisomal con herencia autosómica dominante o

recesiva ²⁵¹. Se han descrito variantes heterocigotas dominantes con efecto negativo en la proteína ²⁵². El gen *OPA1*, codifica una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna involucrada en el mantenimiento de la estructura mitocondrial y de la producción de energía mediante los procesos de fusión de la membrana interna y el mantenimiento de la estructura de las crestas. Defectos en este gen están asociados al síndrome de depleción de ADN mitocondrial, de herencia autosómica dominante ²⁵³.

En la paciente 670, estudiada por el panel de defectos en el metabolismo de moléculas complejas, y uno de los ejemplos con orientación diagnóstica por biomarcadores, presentaba elevación de ácido siálico en orina, una frente y nariz ancha, hipotonía troncular leve y hernia umbilical, fue identificada una variante heterocigota en el gen *GNE*, asociado a la sialuria. Este gen codifica una enzima bifuncional que regula la síntesis del ácido N-acetilneuramínico, un precursor de los ácidos siálicos, limitando la velocidad del metabolismo en la vía biosintética del ácido siálico, esencial para la adhesión celular y transducción de señales celulares ²⁵⁴. Esta variante fue identificada también en las hermanas de la paciente que presentaban valores elevados de ácido úrico, sin embargo, aunque la madre también presentaba valores elevados de este biomarcador, el test genético materno para esta variante en *GNE* fue negativo, lo que sugiere que estamos ante un caso de mosaicismo. Aunque hasta el momento no se han descrito casos de mosaicismo en este gen, Leroy ha reportado el caso de una paciente con presentación clínica similar al de la paciente 670, con una variante heterocigota en *GNE*, heredada de la madre también con valores elevados de ácido úrico ²⁵⁵.

En los varones, al ser portadores de un único cromosoma X, se usa el termino hemicigosis para describir la presencia de una variante en un gen localizado en dicho cromosoma. En las mujeres, que poseen dos copias del cromosoma X, sucede un proceso de inactivación aleatoria del mismo cromosoma en cada célula, de manera que haya solo una copia activa de los genes localizados en el cromosoma X, dando lugar a una situación de hemicigosis funcional. Debido a que este proceso

es independiente en cada célula, en las mujeres se produce un fenómeno de mosaicismo con respecto al uso de cualquiera de las dos copias genéticas del cromosoma X disponibles y que no hayan sido inactivadas. Los hijos varones afectados de una enfermedad ligada al X pueden descender de madres portadoras en heterocigosis y no afectadas por la enfermedad. Este tipo de herencia ligada al X sucede en algunos ECM ²⁵⁰. Ejemplos de este patrón hereditario son los trastornos de almacenamiento de glucógeno IXa, una de las glucogenosis más leves, asociados al gen *PHKA2* que codifica la subunidad alfa-2 de la enzima fosforilasa quinasa hepática. En nuestra cohorte se han identificado 4 pacientes varones, estudiados por el panel de hipo/hiperglucemias, con variantes en este gen. El paciente 66, con una variante de *splicing* heredada de la madre, y variantes *frameshift* en el paciente 645, y *missense* en los pacientes 763 y 764. En estos últimos 3 casos, aunque los estudios familiares no fueron realizados para determinar la segregación de la enfermedad, sus clasificaciones como probablemente patogénicas a través del sistema de clasificación de ACMG, la compatibilidad del fenotipo clínico asociada al gen y la valoración por parte del clínico responsable permitió validar estos resultados como diagnósticos positivos.

Otros ejemplos de ECM con herencia ligada al X fueron detectados en el estudio de los paneles de defectos de metabolismo intermediario y el de moléculas complejas. El paciente 662, un varón que presentaba hematuria, hipercalciuria, calcificaciones renales y prostáticas, y fue diagnosticado de síndrome Kelley-Seegmiller después de ser identificada la variante c.424A>G, heredada de la madre asintomática, en el gen *HPRT1*. Este gen codifica a una proteína con un papel central en la biosíntesis de los nucleótidos de purina ²⁵⁶. En el paciente 746, de 1 año, con retraso psicomotor grave desde los 5 meses, de predominio postural, estrabismo, aumento del ácido láctico en sangre y en el líquido cefalorraquídeo (LCR), y retraso en el proceso de mielinización, se detectó una variante en hemicigosis en el gen *SLC16A2*. Este gen que codifica una proteína integral de membrana que funciona como un transportador de la hormona tiroidea está asociado al síndrome de Allan-Herndon-Dudley, un trastorno caracterizado por una severa discapacidad intelectual y afectación de los movimientos ^{257,258}.

También en el estudio del panel de enfermedades mitocondriales fue identificado un caso de herencia ligada al X, aunque esto no es lo habitual para estas patologías ²⁵⁹. Fue detectada una variante *de novo*, en el gen *PDHAI*, en el paciente 192, un varón de 4 años que presentaba desde los 18 meses una gastroenteritis aguda febril, debilidad con pérdida de fuerza generalizada, arreflexia, ptosis fluctuante y alteración del nivel de conciencia con tendencia al sueño y a la hiporreactividad. En su evolución ha presentado episodios, fundamentalmente tras cuadros infecciosos, consistentes en: ataxia, debilidad muscular proximal y facial, posible afectación de la musculatura ocular, mialgias y temblor cefálico y de extremidades superiores con una recuperación progresiva en varios días. El gen *PDHAI* está asociado a la deficiencia de la enzima alfa-E1 piruvato deshidrogenasa, y la clínica presentada por el paciente es consistente con la descrita en la literatura ²⁶⁰.

5.2. ARQUITECTURA MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

En los siguientes apartados se discuten los resultados de esta tesis con relación al uso de la NGS en el diagnóstico de las enfermedades neurológicas, señalando sus fortalezas y debilidades y planteando a partir de estos resultados el futuro del diagnóstico genético de estas patologías.

5.2.1. Herencia dominante y el papel de las variantes *de novo* en las enfermedades neurológicas

Las variantes *de novo* surgen a lo largo del genoma durante la formación de los gametos o a nivel postcigótico, aunque la aparición de variantes *de novo* pueden también surgir durante el periodo postnatal o incluso en la vida adulta en las líneas celulares germinales o somáticas ²⁶¹. Su aparición se debe principalmente a errores durante la replicación del ADN como resultado de la incorporación incorrecta de nucleótidos por la ADN polimerasa, y que no se corrigen mediante los mecanismos de reparación, originando SNV *de novo*, y errores en la recombinación

homóloga no alélica durante la meiosis y que son responsables de la aparición de CNVs ^{262,263}. La tasa de mutación estimada para las SNV *de novo* es de 1.8×10^8 por nucleótido, lo que corresponde a alrededor de 44 a 82 variantes en el genoma de un individuo, de media, afectando una o dos de esas variantes *de novo* azonas codificantes ^{262,264}.

Las variantes *de novo* suelen estar asociadas a varios factores como son el sexo del paciente: las SNV *de novo* ocurren con mayor frecuencia en varones, y los indels y CNVs *de novo* en las mujeres ^{265,266}, sin embargo, los SNVs *de novo* identificados en nuestra cohorte de pacientes con sospecha de enfermedad neurológica fue similar en ambos géneros, en ambas situaciones. En 38 pacientes mujeres y 34 pacientes varones fueron identificadas SNV *de novo*, de la misma manera que, en 6 pacientes mujeres y 8 pacientes varones, fueron identificados indels o CNVs *de novo*. Otro factor asociado con estas variantes, es la arquitectura específica del genoma como las regiones ricas en los nucleótidos GC, conocidas como regiones GpC y con tasas elevadas de mutación ¹³⁵.

Debido a que son variantes que surgen de eventos raros, las variantes *de novo* representan la forma más extrema de variación genética: son más deletéreas en promedio que las variantes heredadas porque no han sido sometidas a selección evolutiva ¹³⁵. Así, estas variantes se asocian a formas esporádicas de enfermedad, al no existir antecedentes familiares ni, por lo tanto, herencia genética. Este modelo *de novo* para enfermedades genéticas neurológicas direcciona esencialmente a una base monogénica de la enfermedad, donde la variante parece producir un evento patogénico ¹³⁵.

La aplicación de los paneles genéticos como herramienta diagnóstica en el estudio de pacientes con trastornos neurológicos, ha destacado el papel relevante de las variantes *de novo* en estas patologías. En particular, en trastornos de neurodesarrollo, como la epilepsia donde fueron identificadas 60% de las variantes *de novo* en nuestra cohorte, una frecuencia alta que se refleja igualmente en la literatura para esta patología ^{267,268}; los defectos de la morfogénesis cerebral, donde fueron identificados 16% de los casos de nuestra

cohorte, y donde variantes *de novo* han sido previamente asociadas a estos trastornos^{269,270} o asociados a la discapacidad intelectual²⁷¹, en nuestra cohorte sólo fueron identificados 4 pacientes (~4%) con variantes *de novo* en genes asociados con este trastorno.

En los últimos años, el conocimiento sobre la base molecular de los trastornos epilépticos ha aumentado significativamente con la identificación de nuevos genes asociados a la epilepsia^{194,272-274,275(p2),276,277(p1),278,279(p2),280}. Los genes responsables de estos trastornos suelen codificar elementos importantes para el correcto funcionamiento de los diversos canales iónicos y proteínas necesarias para la sinapsis, su regulación, y sinaptogénesis. Así, la gran mayoría están asociados a canalopatías, donde aproximadamente una cuarta parte de los genes identificados codifican proteínas de canal iónico, incluidos los canales activados por voltaje (canales Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y canales activados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización) y canales iónicos activados por ligando²⁸¹, o afectan a la actividad de los neurotransmisores excitadores o inhibidores del sistema nervioso central^{282,283}.

En nuestra cohorte, con 53 de los 226 (23,45%) pacientes diagnosticados genéticamente, se ha detectado que los genes donde se han identificado más frecuentemente variantes patogénicas fueron en *SCN1A* (15, 28.3%), *KCNQ2* (11, 19.6%), *CDKL5* (6, 10.7%), *FOXG1* (3, 5.0%), y *SCN2A* (2, 4.0%). Estos resultados son similares a los descritos en un estudio publicado recientemente, donde la tasa de diagnóstico del panel de epilepsia es de 28,5%²⁸⁴. En este trabajo se analizó el rendimiento genético de un panel de epilepsia donde en 30 de los 105 pacientes los genes más frecuentemente mutados serían *SCN1A* (6, 20%), *KCNQ2* (4, 13.3%), *CDKL5* (3, 10.0%), *FOXG1* (2, 7.0%), y *SCN2A* (2, 7.0%). En nuestra cohorte, en 4 de estos genes todas las variantes detectadas y causantes de enfermedad ocurrieron *de novo* en el paciente (*KCNQ2*, *CDKL5*, *FOXG1* y *SCN2A*). En el caso del gen *SCN1A* el 75% (9/12) de las variantes fueron *de novo*, mientras que en 3 pacientes (548, 829 y 1112) las variantes fueron heredadas de uno de

los progenitores que presentaban cosegregación con la enfermedad. Las variantes *de novo* en *SCN1A* son frecuentes. En un estudio previo, Claes ha descrito que, en 7 pacientes no relacionados entre sí, con sospecha de epilepsia mioclónica severa de infancia, fueron identificadas variantes *de novo* en todos los casos ²⁸⁵.

De manera general, en los pacientes diagnosticados por el panel de epilepsia, en 35 fueron detectadas variantes *missense* patogénicas en genes asociados a: canalopatías (*HCN1*, *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *KCNQ2*, *KCNA2*); al metabolismo intermediario (*ARHGEF9*, *DHDDS*); sinaptogénesis (*DNM1*, *STXBP1*); receptores neuronales (*GRIN2A*) y morfogénesis cerebral (*FOXG1*, *ARX*). Además, se identificaron variantes *frameshift* en 4 pacientes, en los genes *CDKL5*, *SCN1A* y *HNRNPU* (este último asociado al metabolismo y transporte del RNA) y variantes *nonsense* en 6 pacientes, en los genes *FOXG1* (asociado al desarrollo cerebral), *MECP2* (codifica para una proteína que se une a las islas CpG metiladas e influye en la transcripción del ADN) y *SCN1A*.

Estos resultados apoyan una etiología genética común entre los fenotipos de epilepsia donde la mayoría de los genes están directamente asociados a algún canal iónico dependiente de voltaje, lo que puede sugerir que alteraciones en la función de la proteína codificada tendrá más consecuencias cuantitativas que la haploinsuficiencia ²⁶⁷; y segundo, parece que la mayoría de las variantes *missense* están más directamente implicadas en la epilepsia que las variantes *frameshift* o *nonsense* ²⁸⁶. Además, estos resultados llevan a que estos genes asociados frecuentemente a un rendimiento diagnóstico elevado en epilepsia, hace que sean candidatos principales de análisis en un primer abordaje en el estudio genético de trastornos epilépticos, es decir, un panel de epilepsia puede ser diseñado específicamente con estos genes característicos ^{287,288}. Aunque es frecuente la identificación de variantes dominantes *de novo* en asociación con los trastornos epilépticos, también es posible encontrar variantes en mosaicismo somático y recesivas (discutido en secciones posteriores).

Los defectos en la morfogénesis cerebral constituyen una amplia variedad de malformaciones complejas que representan una fracción significativa de los trastornos del neurodesarrollo de inicio en la infancia. En nuestra cohorte se han detectado en total 11 variantes *de novo* en genes asociados a lisencefalia, microcefalia y macrocefalia. En la mayoría de los casos, en 6 pacientes, la causa genética más común de su patología fue la presencia de variantes patogénicas en los genes asociados a lisencefalia: *DCX* (pacientes 69 y 480), *ARX*, *RELN* (paciente 112), *PAFAH1B1* (paciente 48 y 121), y en genes codificantes de tubulinas, componentes de los microtúbulos, *TUBB2A* (paciente 581) ^{289,290}. La microcefalia y la megalencefalia están asociadas generalmente a un patrón de herencia recesiva, sin embargo, la herencia dominante también está presente en este tipo de patologías y fue detectada en este trabajo ^{291,292}. En tres pacientes con microcefalia, 430, 517 y 995, fueron detectadas variantes *frameshift de novo* en tres genes diferentes *SHH*, *KIF11* y *EFTUD2*, respectivamente. En dos pacientes, 86 y 422, fueron identificadas variantes *de novo* en el gen *PIK3R2*, que codifica una proteína de la familia de las quinasas y está asociado al síndrome de megalencefalia-polimicrogiria-polidactilia-hidrocefalia.

La discapacidad intelectual está también asociada con la presencia de variantes *de novo* en genes que codifican proteínas con función en el mantenimiento de la homeostasis celular. Es el caso del gen *SLC9A6*, involucrado en la estabilidad del pH y volumen de las endosomas, que ha sido asociado con discapacidad intelen este gen fue identificada en el paciente 164, con encefalopatía epiléptica que cursa con desaceleración del crecimiento, retraso psicomotor global, ausencia de lenguaje propositivo, estereotipias bucomanales e hipotonía axial. En el paciente 1102, fue detectada una variante *frameshift de novo*, en el gen *ADNP*, que codifica una proteína de dedo de zinc que contiene un homeodominio con actividad de factor de transcripción, esencial para la formación del cerebro ²⁹³.

En nuestra cohorte de pacientes estudiados por el panel de trastornos neuromusculares, se ha obtenido un rendimiento diagnóstico

de 36,9%, superior al rendimiento de 30% descrito recientemente por Beecroft ²⁹⁴. La alta incidencia de variantes *de novo* fue uno de los hallazgos más significativos asociados al aumento del conocimiento sobre la genética de estos trastornos ²¹³ y en este trabajo se han identificado variantes *de novo* en 9 de los 31 pacientes diagnosticados. En tres de ellos, pacientes 529, 766 y 908, se identificaron variantes en genes asociados a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, *MPZ*, *MFN2* y *DNM2*, respectivamente. En el paciente 195, con neutropenia, talla baja, obesidad troncular, discreto aumento del ácido láctico y afectación muscular con debilidad proximal, fue identificada una variante en el gen *TAZ*, asociado al síndrome de Barth. En dos pacientes, 197 y 876, fueron detectadas variantes *de novo* en el gen *KBTBD13*, asociado a la miopatía nemalinica. El paciente 255 presentaba defectos en el gen *MYH7* que codifica la subunidad de cadena pesada beta (o lenta) de la miosina cardíaca, se expresa predominantemente en el ventrículo humano normal y también en los tejidos del músculo esquelético ricos en fibras ²⁹⁵. En el paciente 565 fue identificada una variante de *splicing* en el gen *COL6A3* asociado al síndrome de Bethlem y en el paciente 880, fue detectada una variante *frameshift* en el gen *DMD* asociado a la distrofia muscular de Duchenne.

Aunque la herencia recesiva no es frecuente en los trastornos neurológicos, hay varios genes que presentan este tipo de patrón. Sin embargo, la contribución relativa de alelos recesivos en estas patologías varía en la población y su frecuencia no está clara ¹³⁵. En nuestra cohorte fueron identificadas varias patologías de herencia recesiva asociadas a la epilepsia, donde se han detectado variantes homocigotas en 3 pacientes (421, 501 y 561) y heterocigotas compuestas en el paciente 954. En los pacientes diagnosticados por el panel de epilepsias, el 1,3% presentó variantes en genes recesivos, sin embargo, en un estudio de Helbig, el rendimiento diagnóstico para estos genes en pacientes con la misma sospecha clínica fue bastante superior, cerca de 7,9% ²⁹⁶. Estudios más recientes han incrementado esta tasa al 38%, respectiva al diagnóstico molecular de pacientes epilépticos alcanzado por la identificación de variantes en genes recesivos ²⁹⁷.

El patrón de herencia recesiva fue detectado con mayor frecuencia en los trastornos neuromusculares, donde fueron diagnosticados 26 de los 31 pacientes. La tasa de diagnóstico de nuestra cohorte fue de 83,8%, superior con la descrita en un estudio reciente, donde han reportado una tasa de 66,7%, diagnosticando 26 de los 31 pacientes, con una enfermedad neuromuscular recesiva ²⁹⁸. Un caso interesante detectado en el panel de enfermedades neuromusculares es el del paciente 146. Este paciente, un varón de 2 años, con artrogriposis múltiple congénita, amioplasia congénita no neurogénica, hipotonía y debilidad severa que condiciona retraso psicomotor, fue identificada la variante *frameshift c.38661_38665del*, en homocigosis, en el gen *TTN*, que codifica la titina, de herencia dominante o recesiva. Esta variante específica, está localizada en una región repetitiva, PEVK, del exón 197, que no está presente en ninguna de las isoformas adultas conocidas, siendo que se expresa sólo en la isoforma esquelética fetal. Estudios genéticos de los progenitores han determinado que la madre era portadora heterocigota de la delección, mientras el padre daba negativo para la variante en ambos alelos. En el paciente 146, todas las variantes localizadas en el cromosoma 2, eran homocigotas lo que se podría suponer una delección del alelo paterno o una isodisomia maternal. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se ha realizado un estudio detallado de 100 SNP homocigotos distribuidos a lo largo del cromosoma 2 para el trío de padres y paciente. En 62 de los 100 SNP fueron informativos y el estudio mostró que todos eran idénticos al del cromosoma 2 maternos, lo que indica que la delección resultó de un rescate monosómico por duplicación del cromosoma 2 ²⁹⁹.

Las ciliopatías son también frecuentemente enfermedades recesivas, y en los 10 pacientes diagnosticados en nuestra cohorte fueron identificadas variantes patogénicas en genes con este patrón de herencia. La tasa de diagnóstico alcanzada fue de 38,5%. Estudios recientes describen tasas de diagnóstico superiores para las mismas patologías con respecto al estudio por panel de genes de 62% y de 44% en el caso del estudio de exoma completo ³⁰⁰.

En los últimos años se han descrito varios genes localizados en el cromosoma X y asociados a enfermedades neurológicas, principalmente a la epilepsia, discapacidad intelectual y defectos de la morfogénesis cerebral ³⁰¹. En 13 de los pacientes estudiados con sospecha de trastorno epiléptico fueron identificados defectos moleculares en genes localizados en el cromosoma X, destacando por su frecuencia el gen *CDKL5*. El rendimiento diagnóstico de este gen en nuestra cohorte es de 10,7%. con 6 pacientes portadores de variantes patogénicas. Kothur ha descrito en su estudio el mismo rendimiento diagnóstico para el mismo gen, alrededor de 10% ²⁸⁴. Variantes en *CDKL5* causan enfermedad por deficiencia de ciclina dependiente de la quinasa tipo 5 con una presentación clínica de epilepsia refractaria de inicio infantil temprano, hipotonía y discapacidad cognitiva y motora. Es una patología que afecta mayoritariamente a las mujeres una vez que los varones que presentan variantes patogénicas en la línea germinal no producen la proteína *CDKL5* correctamente y no suelen sobrevivir a la etapa fetal (Olson *et al.*, 2019).

En pacientes con epilepsia, dos de los genes ligados al X identificados con más frecuencia son *MECP2* y *CLCN4* ³⁰³. En nuestra cohorte se han detectado variantes en el gen *MECP2* en dos pacientes: el paciente 385, con encefalopatía epiléptica y sin historia familiar relevante fue identificada una variante *nonsense de novo*; y en el paciente 572, con hipotonía de origen no filiado progresiva, con movimientos oculares anormales y retraso psicomotor con epilepsia sintomática (hermano fallecido por cuadro similar), fue identificada una variante patogénica *missense* para la que no fue posible determinar el patrón de herencia, pero dada la predicción de patogenicidad y la valoración del clínico, el diagnóstico fue confirmado. El gen *MECP2* codifica una proteína asociada a la cromatina implicada en la regulación de la transcripción y es crucial para la maduración de las neuronas y el neurodesarrollo. Defectos en él pueden causar el síndrome de Rett, encefalopatía neonatal severa y discapacidad intelectual (Swanberg *et al.*, 2009). En otros 2 pacientes fueron identificadas variantes *missense* en el gen *CLCN4*, que codifica una proteína que pertenece a la familia

de canales de cloro dependientes de voltaje y se expresa ampliamente en el cerebro localizándose predominantemente en vesículas intracelulares. Aunque su función fisiológica no está clara, se considera que podría estar involucrado en la homeostasis iónica de los endosomas y tráfico intracelular (Palmer *et al.*, 2018). En el paciente 901, la variante *missense* identificada en *CLCN4* fue heredada de la madre, estando también presente en su hermano, y en un tío materno, ambos afectados. En el caso del paciente 1177, varón con discapacidad cognitiva y encefalopatía epiléptica, los estudios familiares no pudieron completarse, pero siguiendo los criterios de la ACMG, la variante fue clasificada como probablemente patogénica. La posterior valoración de los resultados genéticos por parte del médico responsable ha permitido concluir la asociación de esta variante con el fenotipo presentado por el paciente 1177.

En los pacientes 69 y 480, estudiados por el panel de defectos de la morfogénesis cerebral, ambos con epilepsia y defectos en la morfogénesis cerebral como el aumento de espacios subaracnoideos, surcos cerebrales profundos y lisencefalia bifrontal, fueron identificadas variantes *missense* en el gen *DCX*. Este gen codifica un miembro de la familia doblecortina. La proteína codificada por este gen es una proteína citoplasmática y contiene dos dominios de doblecortina, que se unen a los microtúbulos. En el desarrollo de la corteza, las neuronas corticales deben migrar a largas distancias para llegar al sitio donde se van a diferenciar. La proteína DCX parece dirigir la migración neuronal al regular la organización y la estabilidad de los microtúbulos. Además, esta proteína interactúa con LIS1, la subunidad gamma reguladora del factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, y esta interacción es importante para la función adecuada de los microtúbulos en el desarrollo de la corteza cerebral. Variantes en este gen causan una migración anormal de las neuronas durante el desarrollo e interrumpen la estratificación de la corteza, lo que lleva a la epilepsia, discapacidad cognitiva, heterotopia de la banda subcortical (síndrome de "corteza doble") en las mujeres y lisencefalia (síndrome del "cerebro liso") en

los varones ³⁰⁶ como sucede con los dos pacientes estudiados en este trabajo.

5.3. EL PAPEL DE LA CNVs EN LA ENFERMEDAD

Los CNVs contribuyen a una fracción sustancial de la variación genética humana y por lo tanto están implicadas en la enfermedad humana y en la evolución del genoma humano ³⁰⁷. A nivel clínico, las CNVs pueden ser clasificadas como patogénicas o posiblemente patogénicas según el tamaño de la misma, el gen afectado, su papel *de novo* y si está asociada a determinado grupo de enfermedades ³⁰⁸. Las deleciones homocigotas y hemicigotas de genes completos y parciales a menudo resultan en alelos nulos y en una pérdida completa de la función génica ³⁰⁹. Además, las deleciones heterocigotas que involucran genes de enfermedades recesivas son una parte importante del estado de portador recesivo de un individuo ³¹⁰ y también contribuyen directamente a la enfermedad al implicar estados heterocigotos compuestos cuando una deleción en un cromosoma homólogo coincide en la misma posición de una variante hipomorfica o con una pérdida de función en el otro cromosoma homólogo ^{310,311}. Entre las enfermedades de neurodesarrollo se estima que las CNVs *de novo* son responsables por el 3,7% de los casos que presentan estas patologías ³⁰⁸, sin embargo, las CNVs heredadas y *de novo*, en su conjunto, se estima que son responsables del 15% de los casos clínicos ³¹².

Actualmente no hay una tasa de mutación estimada para las CNVs *de novo* debido a los problemas en la identificación de las mismas mediante las tecnologías NGS ³¹³. Las CNVs *de novo* surgen a menudo en regiones flanqueadas por duplicaciones segmentarias (las cuales son secuencias de ADN con >90% de similitud de secuencia dispersas por todo el genoma humano) debido al cruce desigual entre las repeticiones durante la recombinación meiótica, conocido como recombinación homóloga no alélica ^{314,315}. La edad avanzada de la madre está también relacionada con este tipo de variantes, y además, suelen conducir a una no disyunción cromosómica involucrada en aneuploidías ²⁶². Existen

evidencias sobre una transmisión materna preferencial de CNVs a la descendencia, ocurriendo con mayor frecuencia de lo esperado por azar. Por ejemplo, más del 90% de las deleciones y duplicaciones *de novo* asociadas al cromosoma 16p11.2 se originan en la línea germinal materna, probablemente debido a la existencia de un sesgo en la tasa de recombinación en esta región que hace que ésta sea 10 veces más frecuente en la madre que en el padre.³¹⁶ En nuestra cohorte sólo en el paciente 215 fue identificada una CNV heredada de la madre, las demás CNVs identificadas fueron *de novo* (4), o estaban localizadas en ambos alelos (4).

La variación fenotípica y el hecho de que se hayan identificado padres portadores "no afectos" indica que estas CNV por sí solas no siempre son suficientes para causar la enfermedad, lo cual tiene sentido porque va a depender de la herencia asociada a la enfermedad, como es el caso del paciente 215, un niño de 5 meses donde fue detectada una deleción del exón 3 del gen *FARS2*, y que había sido heredada de la madre no afecta. En este caso específico, este gen está asociado a una deficiencia de fosforilación oxidativa de herencia recesiva, el paciente además de la CNV presenta una variante *missense* heredada del padre en el mismo gen.

En este estudio se han identificado un total de 10 CNVs potencialmente patogénicas: 9 deleciones y 1 duplicación, en pacientes con trastornos de neurodesarrollo, con excepción de los pacientes 215 (estudiado por el panel de enfermedades mitocondriales) y 254 (estudiada por el panel de Metabolismo Intermediario). Esta paciente con menos de un mes de vida presentaba sepsis, anorexia, gingivitis, anemia, leucopenia, trombopenia y homocisteína elevada, y fue identificada una deleción en homocigosis del exón 8 en el gen *TCN2*, asociado a la deficiencia de la transcobalamina II.

Las CNVs representan una proporción sustancial de la carga genética en aproximadamente el 3% de los pacientes con epilepsias idiopáticas y aumentan el riesgo de epilepsia generalizada idiopática y una amplia gama de trastornos del desarrollo neurológico³¹⁷⁻³²⁰. En el

análisis de los resultados del panel de epilepsia se ha detectado CNVs *de novo* en dos pacientes. En la paciente 71, que presentaba convulsiones neonatales refractarias fue identificada una duplicación *de novo* de un cluster de genes en el cromosoma 2 que estarían implicados en la regulación y funcionamiento de los canales de sodio: *SCN1A*, *SCN2A* y *SCN9A*. CNVs *de novo* asociadas a estos genes y relacionadas con epilepsia han sido descritas previamente en la literatura ³²¹. En el paciente 1058, un varón de 7 años con epilepsia y retraso en el neurodesarrollo fue detectada una deleción afectando al gen *IL1RAPL1* que incluye los exones 2 al 8. Este gen codifica una proteína de la familia de receptores de interleucina 1 y es similar a las proteínas accesorias de interleucina 1. Esta proteína tiene un péptido señal N-terminal, tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina Ig, un dominio transmembrana, un dominio intracelular Toll / IL-1R y una larga cola C-terminal que interactúa con múltiples moléculas de señalización. Este gen está ubicado en una región del cromosoma X que está asociada con una forma no sindrómica de discapacidad intelectual ligada al cromosoma X. Este gen se expresa principalmente en las estructuras cerebrales postnatales involucradas en el sistema de memoria del hipocampo, lo que sugiere un papel especializado en los procesos fisiológicos que subyacen a la memoria y las habilidades de aprendizaje, y juega un papel en la formación y estabilización de sinapsis. Defectos moleculares afectando a este gen han sido descritos en pacientes con discapacidad intelectual ³²².

En dos pacientes estudiados por el panel de defectos de la morfogénesis cerebral, pacientes 48 y 121, fueron identificadas en el gen *PAFAH1B1* deleciones de los exones 10 y 11 y una deleción del exón 1, respectivamente, ambas *de novo*. Este gen codifica la subunidad alfa del acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas. Defectos en este gen causan lisencefalia asociada con el síndrome de lisencefalia de Miller-Dieker ³²³.

En tres pacientes con sospecha de enfermedad neuromuscular (paciente 282), trastorno del movimiento (paciente 1182) y ciliopatias

(paciente 586), fueron detectadas CNVs homocigotas en genes asociados con su patología, *SIGMARI*, *SACS* y *TTC8*, respectivamente. Además, en un paciente de 9 años (paciente 1203), se ha detectado una macrodelección hemicigota en el gen *DMD*, asociado a la distrofia muscular de Duchenne, que incluye los exones 21 al 33.

5.4. VARIANTES RECURRENTES

Varias enfermedades pueden estar vinculadas a un pequeño número de variantes patogénicas que afectan a la proteína de una manera específica, y la identificación de la recurrencia de estas es esencial no sólo para determinar los genes y las enfermedades asociadas a estas variaciones, sino que también ayudan a simplificar el diagnóstico final de determinada patología. De hecho, muchas de estas variantes están presentes en una población determinada con asociación directa a trastornos metabólicos o neurológicos específicos. Estas variantes suelen ser objeto de estudios funcionales para confirmar su patogenicidad, lo que facilita su clasificación como causal de enfermedad.

En dos pacientes de nuestra cohorte, 60 y 1024, ambos con epilepsia y retraso tanto a nivel cognitivo como motor, estudiados por el panel del Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucoditrofias y NeuroExoma respectivamente, fue identificada la variante c.533G>A en el gen *HEXA*, asociado a gangliosidosis. En el paciente 60, de 5 años de edad, la variante fue detectada en heterocigosis compuesta y en el paciente 1024, de 6 años de edad, fue detectada en homocigosis. Este cambio de secuencia reemplaza la arginina por la histidina en el codón 178 de la proteína HEXA (p.Arg178His). Es una variante recurrente que representa aproximadamente el 55% de todos los alelos patogénicos identificados en el gen *HEXA*³²⁴. El residuo de arginina está altamente conservado y existe una pequeña diferencia fisicoquímica entre arginina e histidina. Se ha demostrado que esta variante está asociada con un fenotipo más leve y con un inicio de enfermedad más tardío³²⁵. Estudios estructurales han demostrado que el codón Arg178 es crucial

para la unión del sustrato y para los pasos intermedios de la reacción, estimándose que la variante Arg178His afecta la región del sitio activo de la proteína, sin embargo, el efecto a nivel funcional es mayor en el caso de las variantes Arg178Lys y Arg178Cys³²⁵. Sin embargo, aunque los dos pacientes presentan la misma variante en homocigosis (1024) y en heterocigosis compuesta (60), la clínica y la evolución de la patología presentada por ambos parece similar. La variante c.533G>A parece ser una causa común de la enfermedad de Tay-Sachs siendo más prevalente en Portugal, aunque también se han identificado en otros países como España e Italia debido a las corrientes migratorias³²⁶⁻³²⁸.

En otros dos pacientes, 634 y 760, estudiados por el panel del Metabolismo Intermediario y ambos con sospecha de fenilcetonuria fue identificada en ambos, en heterocigosis compuesta, la variante c.782G>A (p.Arg261Gln) en el gen *PAH*. Esta variante, heredada de los progenitores, implica la alteración de un nucleótido conservado en la posición 261 y es donde se localiza el aminoácido aromático hidroxilasa, C-terminal de la proteína fenilalanina-4-hidroxilasa. Esta variante ha sido asociada con hiperfenilalaninemia benigna y fenilcetonuria clásica que requiere tratamiento dietético^{329,330}, y presenta una frecuencia alélica de 5,3-5,5%^{331,332}. Estudios *in vitro* han demostrado además que la variante c.782G>A altera la función de la proteína y la enzima resultante retiene una cierta actividad residual, entre 6,3-11%, lo que explicaría el fenotipo moderado asociado a esta variante³³³.

En dos pacientes no relacionados entre sí y estudiados por el panel de defectos de la morfogénesis cerebral, paciente 86 y 422, fue identificada en ambos la variante heterocigota c.1117G>A (p.Gly373Arg) en el gen *PIK3R2*. Este gen codifica la subunidad reguladora beta del complejo enzimático fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que es fosforilado para generar PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). PIP3 se une al complejo AKT (serina/treonina quinasa) y conduce la fosforilación de la vía de señalización PI3K-AKT-MTOR (mammalian Target of Rapamycin), desempeñando un papel

importante en la regulación de la señalización celular y está implicada en el acoplamiento del estímulo de crecimiento y la progresión del ciclo celular^{334,335}. Estudios funcionales publicados proponen que defectos moleculares en este gen dan como resultado una mayor actividad de PI3K comparados con la línea celular de control³³⁶.

En tres pacientes, con diagnóstico no concluyente por falta de estudio familiar, que presentaron convulsiones en el primer año de vida, fue detectada la misma variante c.649dupC (p.Arg217fs) en el gen *PRRT2*. Son el caso 975, un niño de 7 meses con crisis epilépticas de difícil control, la paciente 207 que a los 6 meses presentó convulsiones de difícil control 15 días después de recibir la vacuna triple vírica (ocurriendo lo mismo con su hermana) y la paciente 1129, una niña con inicio de crisis convulsivas en los primeros meses de vida. La variante c.649dupC es una variante patogénica recurrente que representa aproximadamente el 77-93% de todos los alelos patogénicos identificados en el gen *PRRT2*. Se ha identificado en individuos con distinto origen y que podrían presentar discinesia kinesigénica paroxística con convulsiones infantiles, convulsiones infantiles familiares benignas y discinesia kinesigénica paroxística aislada^{221,337-339}. Esta duplicación provoca un cambio del marco de lectura que empieza en el 217, cambiando la Arginina por una Prolina creando un codón stop prematuro en la posición 8 del nuevo marco de lectura, denotado como p.Arg217ProfsX8. Esta variante patogénica puede causar la pérdida de la función normal de la proteína, ya sea a través del truncamiento de proteínas o por la degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras (*nonsense mediated decay*) (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2015, 1993).

5.5. HERENCIA DIGÉNICA

Clásicamente se ha asumido que los fenotipos asociados con herencia Mendeliana eran el resultado de defectos en un único gen o locus. En 1994, se publicó la primera evidencia de herencia digénica

asociada a la retinitis pigmentosa ³⁴². En 3 familias fueron identificadas variantes en dos genes no relacionados entre sí, es decir, no en desequilibrio de ligamiento, codificando ambas proteínas específicas de fotorreceptores, *ROM1* (codifica una proteína de membrana integral que se encuentra en el borde del disco del fotorreceptor del ojo) y *PRPH2* (codifica una glucoproteína de la superficie celular que se encuentra en el segmento externo de las células fotorreceptoras). Posteriores estudios moleculares confirmaron que ambas proteínas interactuaban y que esta asociación es crucial para la formación estable de los discos fotorreceptores ³⁴³.

Actualmente no existe consenso sobre la definición de herencia digénica. Deltas define este tipo de herencia como la forma más simplificada de herencia oligogénica sin seguir la herencia mendeliana, donde las variantes, localizadas en genes diferentes, por sí solas no son causales de enfermedad ³⁴⁴. Así, la herencia digénica puede referirse a diferentes escenarios. En algunos casos, el fenotipo de la enfermedad es causado por una combinación de variantes en dos genes diferentes, representando así la forma más simple de la herencia oligogénica; en otras situaciones, puede haber una variante primaria en un determinado gen responsable por la enfermedad pero la presencia de una segunda variante en genes modificadores puede alterar la manifestación final del fenotipo clínico; mientras que en otros casos puede haber una segregación independiente de dos enfermedades por separado, cada una causada por variantes en genes diferentes con patrón de herencia mendeliana.

Hay varios factores a tener en cuenta en el análisis de casos con sospecha de herencia digénica. Primero, la segunda variante localizada en un locus específico puede aumentar o disminuir el riesgo de enfermedad. En un estudio publicado en 2012, describen como variantes heterocigotas en el gen *MKKS* pueden mitigar el efecto de variantes patogénicas en el gen *CEP290*, asociado a la amaurosis congénita de Leber (Rachel *et al.*, 2012). Segundo, el ligamiento genético influye en casos de herencia digénica. Por ejemplo, en el síndrome de Rotor, asociado a dificultades en el procesamiento y transporte de bilirrubina, de herencia recesiva, fueron identificadas

variantes bialélicas en genes localizados en el mismo loci, *SLCO1B1* y *SLCO1B3*(van de Steeg *et al.*, 2012). Aunque uno de los ejemplos más estudiados es la sordera como resultado de variantes en los genes *GJB2* y *GJB6*. Ambos genes están en el cromosoma 13, y codifican proteínas del complejo de la conexina. Se ha descrito comodelecciones en *GJB6* inactivan el segundo alelo de *GJB2* ³⁴⁷. Y por último, una de las principales evidencias confirmatorias de herencia digénica es la existencia de interacciones entre las proteínas involucradas en el defecto molecular ^{344,348}.

En este estudio se han identificado 2 casos posiblemente asociados a una herencia digénica.

Un caso probable de herencia digénica se identificó al estudiar el caso de dos hermanos, pacientes 501 y 968, que presentaban ambos epilepsia, aunque con una expresión clínica de la enfermedad diferente. Los resultados genéticos se describen a continuación:

<i>Probandos</i>	<i>SCN1A</i>	<i>CACNA1A</i>	<i>SLC12A5</i>
501	HT	-	HO
968	HT	HT	HT
Madre	HT	-	HT
Padre	-	HT	HT

TABLA 43 - RESULTADOS GENÉTICOS DE LOS HERMANOS 501 Y 968, Y PROGENITORES.

El paciente 501, varón de 12 años, que presentaba encefalopatía epiléptica de inicio en los primeros meses de vida con electroencefalograma (EEG) sugestivo de convulsiones migratorias malignas, era portador de una variante *missense* patógena en homocigosis en el gen *SLC12A5*, además de una variante probablemente patógena en heterocigosis en el gen *SCN1A* heredada de la madre. La hermana del paciente, la paciente 968, presentaba un fenotipo más leve consistente en crisis de ausencia bien controladas con valproato, y era portadora de una combinación de variantes

heterocigotas heredadas en genes que codifican canales iónicos: *SCN1A* (materno), *CACNA1A* (paterno) y *SLC12A5* (materna). El gen *SCN1A* codifica la subunidad alfa del canal de sodio, el cual tiene cuatro dominios homologos, permitiendo la permeabilidad y el flujo de estos iones³⁴⁹. El gen *SLC12A5* codifica una proteína integral de membrana la cual funciona como cotransportador de potasio y cloro, regulando el flujo de neto de iones, dependiendo de los gradientes de concentración (Hübner *et al.*, 2001). El gen *CACNA1A* codifica la subunidad de un poro transmembrana del canal de calcio mediando el flujo de estos iones³⁵¹. Las variantes identificadas en ambos genes se clasifican como probablemente patogénicas, con excepción del *CACNA1A*, que es una variante de significado incierto. Ambos padres son portadores de alguna de las variantes identificadas y son asintomáticos. Sin embargo, en la paciente 968, es probable que estemos en un escenario de segregación independiente de dos enfermedades de herencia dominante, cada una causada por defectos en genes diferentes, en *SCN1A* y *SLC12A5*.

En el paciente 1167, un niño de 6 años con hipoglucemias cetósicas y una posible alteración de la neoglucogénesis, con hipotiroidismo subclínico normalizado posteriormente, pseudoestrabismo, convulsiones febriles parciales del lado derecho y crisis tónico-clónica de predominio en las extremidades superiores y con desconexión del medio, secundaria a la hipoglucemia. Fueron identificadas una variante heterocigota en el gen *ABCC8*, asociado a la diabetes mellitus y variantes heterocigotas compuestas en el gen *SLC37A4*, asociado a la enfermedad de almacenamiento del glucógeno I. El estudio de portadores no se llevó a cabo debido que las muestras de los progenitores no estaban disponibles.

<i>Paciente</i>	<i>ABCC8</i>	<i>SLC37A4</i>
<i>Hipoglucemia neonatal</i>	X	
<i>Pseudoestrabismo</i>	X	
<i>Convulsiones (crisis tónico-clónica con desconexión del medio)</i>	X	
<i>Acidosis metabólica (hiperlactacidemia)</i>		X
<i>Hipoglucemia cetósica</i>		X

TABLA 44 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL PACIENTE 1167 QUE COINCIDEN CON LO DESCRITO EN LOS GENES *ABCC8* Y *SLC37A4*.

El gen *ABCC8* codifica una proteína, miembro de la superfamilia de transportadores de unión a ATP y funciona como modulador de los canales de potasio sensibles al ATP y en la liberación de insulina³⁵². El gen *GCK* codifica la glucoquinasa, un sensor de glucosa que regula su concentración extracelular, y el aumento de glucosa en plasma conduce a una mayor actividad de GCK que produce ATP, aumentando la ratio citoplasmática de ATP:ADP. La liberación de insulina de las células β está regulada principalmente por el canal de potasio sensible al ATP (KATP) ubicado en la membrana de las células β pancreáticas, mantenida por la interacción entre los genes *ABCC8/GCK*. Por otra parte, el gen *SLC37A4* regula el transporte de glucosa-6-fosfato (G6P) desde el citoplasma hacia el retículo endoplasmático para mantener la homeostasis de la glucosa y junto con la glucosa-6-fosfatasa, codificada por el gen *G6PC3*, forma un complejo responsable por la producción de glucosa a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis. La GCK cataliza el paso inicial en la utilización de la glucosa por las células beta y el hígado³⁵³. La glucoquinasa tiene un alto K_m (constante de Michaelis-Menten [KM] es un parámetro cinético donde la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima), por lo que es efectiva solo cuando la

glucosa es abundante, y uno de los papeles de GCK es proporcionar G6P para la síntesis de glucógeno^{354,355}. Así, los defectos identificados en los genes *ABCC8* y *SLC37A4*, podrían resultar en un fenotipo clínico heterogéneo, como el presentado por el paciente 1167, debido a que las consecuencias funcionales parecen interaccionar en la misma vía metabólica, donde la GCK parece tener un importante papel como intermediaria en el metabolismo de ambas proteínas, *ABCC8* y *SLC37A4*.

5.6. MOSAICISMO

Mosaicismo hace referencia a la existencia dentro de un mismo individuo de dos poblaciones de células distintas genéticamente, consecuencia de un evento mutacional post-cigótico. Se ha demostrado que, durante el desarrollo del embrión, se produce una acumulación de variantes SNVs o incluso CNVs, asociadas a la división celular durante la mitosis, lo que puede resultar en distintos niveles de mosaicismo germinal y/o somático a lo largo de los diferentes tejidos³⁵⁶. Así, un individuo puede presentar dos o más genotipos distintos en diferentes poblaciones de células: el mosaicismo en la línea germinal (gonadal) que se refiere a la presentación de diferentes genotipos en el genoma de las células de la línea germinal; el mosaicismo somático, donde la variante se origina en las células somáticas durante el desarrollo embrionario temprano, y el mosaicismo gonosomal, puede ser detectada tanto en las células somáticas como células germinales³⁵⁷. El mosaicismo esporádico *de novo* ocurre en un individuo particular; el mosaicismo parental puede ser transmitido y manifestarse en la descendencia. Las variantes en la línea germinal pueden ser identificadas con relativa facilidad ya que están presentes en cualquier tejido de un individuo afectado. Sin embargo, la identificación de variantes somáticas puede ser más compleja³⁵⁸ y las consecuencias fenotípicas dependen de muchos factores, incluyendo la etapa de desarrollo en la que ocurre la variante, las áreas del cuerpo afectadas y su efecto fisiopatológico.

En nuestra cohorte se han detectado cerca de varios casos de posible mosaicismo que fueron clasificados como diagnóstico no concluyente. Cada vez hay más evidencias de que los eventos mutacionales post-cigóticos ocurren con mucha más frecuencia de lo que se pensaba, y pueden representar un porcentaje significativo de la variación genética causante de enfermedad humana^{356,358,359}. En los últimos años se ha descrito mosaicismo asociado a enfermedades del neurodesarrollo³⁵⁸. Esto puede ser porque el cerebro humano es especialmente susceptible a variantes somáticas, especialmente durante la neurogénesis donde se forman cerca de 10^5 neuronas por minuto, entre la 4ª y 24ª semanas de gestación, con una tasa de mutación alta, ~5,1 SNV por día y por progenitor^{360,361}. Hay diferentes mecanismos genéticos en los cuales la variante somática puede originar una enfermedad de neurodesarrollo: el mosaicismo parental, descrito anteriormente, y el mecanismo Knudson 2-hit donde un paciente puede heredar una variante germinal de uno de sus progenitores y aparecer posteriormente durante el desarrollo una segunda variante en el mismo u otro gen, originando un efecto aditivo y causando la enfermedad³⁵⁸.

Las tecnologías NGS han destacado el papel del mosaicismo en la enfermedad y en particular en enfermedades del neurodesarrollo³⁵⁸. El 77% de los casos con sospecha de mosaicismo fueron identificados en los paneles asociados a enfermedades de neurodesarrollo: por el panel de epilepsia (32/70); panel de defectos morfogénesis cerebral (3/70), panel de discapacidad intelectual (5/70) y neuromuscular (11/70).

En el caso 153, un paciente de 6 años, que presentaba retraso psicomotor, movimientos distónicos y tendencia a hipertensión a los 14 meses, a los 5 años fue evaluado por parálisis cerebral infantil distónica, presentaba además endotropía acumulativa y estrabismo leve hipermetrópico. Este paciente se estudió por el panel de NeuroExoma, y se ha identificado una variante *missense* patogénica en el gen *GRIN2A*, asociado a la epilepsia focal, con trastorno de habla y con o sin discapacidad intelectual. Esta variante fue detectada también en la hermana afectada, pero no fue identificada en ninguno de los progenitores,

lo que apoya la hipótesis de que esta mutación es consecuencia de un mosaicismo germinal en uno de los padres ³⁶².

En el caso 670, una paciente con elevación de ácido siálico en orina, frente y nariz ancha, hipotonía troncular leve, hernia umbilical. Se estudió el panel de defectos del metabolismo de moléculas complejas y fue identificada una variante patogénica en *GNE*, asociado a la sialuria. Se hizo el estudio de portadores y esta variante fue identificada en ambas hermanas afectas, sin embargo, no fue posible detectarla en la madre que presentaba también sintomatología clínica pero más moderada. En un intento de demostrar mosaicismo maternal, y sin someter a la paciente a pruebas invasivas, se han estudiado otras muestras como la saliva y exudado vaginal, sin embargo, la variante en *GNE* no fue identificada.

El mosaicismo parental asociado a *SCN1A* ha sido descrito en diversos trabajos en los últimos años. Se ha detectado una alta incidencia (al menos del 7%) de mosaicismo parental en familias con epilepsia hereditarias relacionadas con *SCN1A*. En estas familias, los progenitores podrían ser asintomáticos, estar levemente afectados o gravemente afectados ^{363,364}, verificado igualmente en nuestra cohorte. Se han identificado variantes heterocigotas en el *SCN1A* heredadas de la madre asintomática: patogénica en los pacientes 968 y 501; y de significado incierto en los pacientes 245 y 801. En el mismo trabajo de Stosser, reportaron mosaicismo de variantes patogénicas en los genes *SCN2A*, *KCNQ2* y *MECP2*, *GABRA1*, *GRIN2B* y *GABRG2*. El mosaicismo parental se ha confirmado en los padres de los pacientes afectados y en 73% de los padres que eran portadores en mosaico, no presentaban ninguna característica neurológica ³⁶⁴. En nuestra cohorte, hemos identificados posibles casos de mosaicismo parental con relación a los genes previamente descritos: paciente 703, con variante patogénica en *SCN2A*, heredada del padre asintomático; y el paciente 904 con variante patogénica en *GABRG2*, heredada del padre que presentó convulsiones hasta los 4 años de edad.

Como ha sido comentado anteriormente, las variantes *de novo* son una causa frecuente en las enfermedades neurológicas graves. Sin embargo, cada vez se publican más trabajos donde describen que las variantes *de novo* identificadas en el paciente, muchas veces están presentes en mosaicismo en uno de los progenitores. En un trabajo publicado en 2015, Acuña-Hidalgo *et al.* describieron como el 6.5% de las llamadas variantes *de novo* eran, de hecho, variantes en mosaicismo post-cigóticas³⁵⁹. En otro estudio publicado en 2017, se identificó en 4 mujeres de la misma familia con discapacidad intelectual y epilepsia, una variante truncante patogénica en el gen *IQSEC2*. Esta variante fue detectada en las dos hermanas vivas, pero no se ha identificado en los padres³⁶⁵. En otro estudio de 2018, se identificó mosaicismo en uno de los padres en 10/120 familias analizadas, y se identificó mosaicismo parental en aproximadamente el 10% de las familias con pacientes con una variante *SCN1A de novo* aparente³⁶⁶. Estos trabajos llaman la atención para la valoración de patogenicidad de una variante que se considera *de novo* por su ausencia en los progenitores.

5.7. LA IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES EN LA VALIDACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS

El ACMG y la Asociación de Patología Molecular (AMP) desarrollaron conjuntamente directrices para la evaluación de criterios que permiten aumentar la consistencia y la transparencia en la interpretación de variantes clínicas detectadas por NGS³⁶⁷. Un tipo de evidencia definida en esta guía es el efecto de una variante en la función de una proteína determinada por un estudio funcional bien establecido que proporciona un fuerte respaldo al impacto patogénico o benigno de esa misma variante. Estos estudios funcionales pueden consistir en pruebas específicas para investigar una determinada variante genética posiblemente patogénica o incluso de significado incierto, identificada en un paciente individual o familiar.

Los estudios funcionales de variantes genéticas posiblemente implicadas en la predisposición a la enfermedad aún son escasos en la mayoría de los centros de investigación u hospitales donde se aplican las tecnologías NGS. Sin embargo, cada vez más se consideran más importantes para la correcta interpretación de los resultados genéticos, principalmente en el área del diagnóstico clínico. Así, los estudios funcionales pueden evaluar el impacto de una variante a diferentes niveles moleculares. A nivel de ARN, las variantes genéticas pueden afectar los niveles de transcripción, el empalme de ARNm o la estabilidad de la transcripción. Los estudios funcionales a nivel de proteína son importantes en la evaluación de la patogenicidad de una variante, siempre que la propiedad evaluada sea relevante para el mecanismo de patogenicidad del gen en esa enfermedad. Una variante puede afectar a la proteína en diferentes etapas moleculares (por ejemplo, expresión y estabilidad, localización subcelular, formación compleja, función específica). Para aquellos genes que codifican dominios de actividad catalítica, los ensayos enzimáticos son una herramienta apropiada para evaluar la alteración de su función particular. Las SNVs también pueden modificar las redes de interacción proteína-proteína, que al mismo tiempo pueden modificar su localización subcelular y la expresión de efectores posteriores. Estas características se pueden evaluar mediante Western Blot, inmunofluorescencia o ensayos de coimmunoprecipitación.

En este estudio, en tres pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, el estudio genético fue posteriormente complementado con estudios funcionales donde la caracterización molecular utilizando fibroblastos del paciente ha permitido confirmar la patogenicidad de las variantes identificadas. Para la realización de estos estudios se ha realizado una estancia internacional en Radboud University Medical Center, Radboud Center for Mitochondrial Medicine, Department of Pediatrics.

En el paciente 43, fueron identificadas dos variantes heterocigotas compuestas en el gen *FOXRED1*, que codifica un factor de ensamblaje

del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Los estudios han demostrado claramente una disfunción mitocondrial debido a una respiración mitocondrial defectuosa con una disminución significativa de la relación OCR / ECAR, de la actividad de OXPHOS y reducción del complejo I. Tanto el paciente como su hermano afecto, portador de las mismas variantes, han presentado una evolución clínica distinta con la previamente descrita asociada al gen *FOXRED1*. No solo el inicio de síntomas clínicos fue posterior, sino también la presencia de acidosis láctica fue tardía y ambos muestran una presentación clínica menos grave que la descrita. A pesar de compartir las mismas variantes patogénicas en *FOXRED1*, ambos hermanos muestran grandes diferencias entre ellos en la expresión clínica de la enfermedad. Nuestro paciente presenta un tono muscular más bajo, estrabismo latente del ojo derecho, presentacrisis repetitivas y bajo rendimiento escolar. El hermano mayor tiene una vida normal, sin dificultades musculares o visuales, con una asistencia escolar normal, aunque con ciertas alteraciones del comportamiento y trastornos del aprendizaje, y nunca tuvo crisis epilépticas. Esta variabilidad clínica sobre la gravedad de la enfermedad asociada a variantes en *FOXRED1* puede interpretarse como resultado de una penetración incompleta, una función residual de la proteína FOXRED1 y / u otros factores que controlan la expresión génica³⁶⁸.

En la paciente 362, se han detectado variantes en heterocigotas compuesta en el gen *EARS2*: una variante *nonsense* heredada del padre, que se describe por primera vez y la variante c.670G> A heredada de la madre y que ya se había identificado en otro paciente con LTBL previamente descrito por Steenweg *et al*³⁶⁹. Aunque esta variante tiene una alta frecuencia, 0.00087 y 0.00119, en bases de datos de poblaciones de alelos como gnomAd y ExAC (especialmente en la población africana), respectivamente, el análisis *in silico* utilizando software para la predicción de patogenicidad la clasifica como patogénica. Los resultados de los estudios funcionales demuestran la patogenicidad de las variantes detectadas en la paciente respaldando una disfunción mitocondrial debido a una respiración mitocondrial

anormal con disminución de la relación OCR / ECAR. La detección de la tasa reducida de consumo de oxígeno y una mayor producción de lactato se debe probablemente al deterioro acumulativo de la respiración por todo el conjunto de complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. También se midió la actividad enzimática de la cadena respiratoria en el músculo del paciente y se ha detectado una deficiencia de los complejos I y III. Sin embargo, en los fibroblastos del paciente solo se detectó una ligera disminución de la actividad del complejo III. A pesar de la grave presentación clínica mostrada por nuestro paciente y el defecto claro en la función mitocondrial en fibroblastos, estas discrepancias entre el músculo y los fibroblastos no son infrecuentes ya que muchas veces a pesar de los defectos en los genes nucleares, los fibroblastos pueden presentar actividad enzimática normal del sistema OXPHOS³⁷⁰.

En el paciente 163, fueron identificadas variantes heterocigotas compuestas en *EARS2*, asociado a la deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa, y una variante homocigota en *AGK*, lo cual codifica una proteína mitocondrial de membrana involucrada en el metabolismo de los lípidos y glicerolipidos, estando asociado al síndrome de Sengers. Nuestro paciente, un varón con diagnóstico prenatal de miocardiopatía dilatada, cataratas congénitas y ectasia piélica que ingresa a las 38 semanas tras la inducción del parto por signos de insuficiencia cardíaca intraútero. Clínicamente empeora al ingreso falleciendo a las 20 horas de vida. Los resultados de los estudios funcionales demuestran la patogenicidad de las variantes detectadas respaldando una disfunción mitocondrial debido a una respiración mitocondrial anormal con disminución de la relación OCR / ECAR. Sin embargo, a nivel funcional no fue posible asociar los efectos patogénicos a *EARS2* o *AGK*, ya que la disfunción mitocondrial podría estar asociada a cualquiera de estos genes, o a ambos. Por otra parte, la gravedad de la presentación clínica del paciente se asemeja a la descrita en la literatura en pacientes con síndrome de Sengers^{245,371}

Actualmente, uno de los principales desafíos en la genética molecular humana es la interpretación de variantes genéticas raras, principalmente aquellas de importancia clínica desconocida. La evidencia concluyente de la patogenicidad de las variantes genéticas es, por lo tanto, crucial. La información resultante del análisis genético y complementación con estudios funcionales, permite no sólo la correcta interpretación y clasificación de las variantes genéticas identificadas, sino que, además, pueden proporcionar información relevante sobre el grado de afectación de la proteína: de que manera influye determinada variante en un dominio específico de la proteína; como puede influir y alterar la estructura cuaternaria de la proteína; de que manera la expresión del ARNm se ve afectada en presencia de una variante patogénica. Esto permite además entender y estimar de que manera otras variantes pueden afectar a la misma proteína, aunque no se las hayan estudiado funcionalmente. Todos los resultados obtenidos y publicados van a permitir además la correcta evaluación e interpretación de variantes detectadas en otros pacientes, permitiendo una resolución diagnóstica cada vez más rápida.

Para el paciente y familiares es muy importante obtener evidencia de la patogenicidad. Por esta razón, sería importante implementar pruebas de genómica funcional en un entorno diagnóstico. Aunque en un entorno diagnóstico, los costes y el tiempo de respuesta de estos estudios son cuestiones importantes a tener en cuenta, ya que suelen tener un coste añadido y un tiempo muy largo de respuesta. Además, las expectativas sobre los posibles resultados de las pruebas funcionales deben manejarse con precaución debido a la posibilidad de resultados falsos positivos o falsos negativos. Por estas y otras razones, aunque hay una consciencia cada vez mayor sobre la importancia de una evaluación correcta de la patogenicidad de las variantes identificadas en tecnologías NGS, sea por paneles, WES o WGS, aún está en debate si estos estudios son adecuados para implementarse en un entorno de diagnóstico.

5.1. TASAS DE DIAGNÓSTICO

Durante la última década, los avances en las tecnologías de secuenciación NGS han tenido un impacto considerable en las pruebas genéticas clínicas y un mayor reconocimiento del papel que desempeñan las pruebas genéticas en la medicina pediátrica. La aplicación de estas tecnologías en el algoritmo diagnóstico de enfermedades metabólicas y neurológicas pueden mejorar no sólo la capacidad diagnóstica de estos trastornos, sino también ofrecer un mejor pronóstico a los pacientes afectados. Entre las distintas estrategias de secuenciación, los paneles genéticos personalizados ofrecen la capacidad de realizar una detección rápida y de bajo coste de los genes comúnmente involucrados en la patogénesis de la enfermedad. En este trabajo, la aplicación de esta herramienta molecular ha permitido concluir el diagnóstico clínico en 195 pacientes, estudiados por paneles genéticos, con una edad media de 6,71 años en mujeres y 7,18 en varones (edades comprendidas entre 0 – 18 años), así como aportar información sobre la arquitectura molecular detrás de estas patologías.

5.1.1. Tasa de diagnóstico en los Paneles Genéticos Individuales

5.1.1.1. Errores Congénitos del Metabolismo (ECM)

De todos los paneles genéticos empleados para el estudio de pacientes con sospecha de enfermedad ECM o neurológica, el panel de Metabolismo Intermediario es el que presenta la tasa de diagnóstico más elevada, donde en el 58,33% de los casos estudiados fue posible obtener un diagnóstico definitivo. Esto se debe a que los pacientes estudiados tienen una presentación bioquímica que permite dirigir la sospecha genética hacia un conjunto de genes bien definidos y asociados con la enfermedad. Por otro lado, en el panel de Metabolismo de Moléculas Complejas, la tasa de diagnóstico positivo es la cuarta más alta, de 35,48%, donde la mayoría de los pacientes diagnosticados

padecían alguna enfermedad lisosomal. En general, los pacientes analizados tenían una sospecha diagnóstica bien fundamentada y orientada ya que se basan no sólo en la historia clínica, sino principalmente en estudios bioquímicos realizados a partir de la sintomatología clínica. Además, todos los pacientes eran seguidos por unidades de metabolopatías, especializadas en el diagnóstico y seguimiento en este tipo de enfermedades, lo que facilita la orientación inicial de la sospecha diagnóstica. Los pacientes con sospecha de ECM han presentado elevadas tasas de diagnóstico en los paneles de defectos en el Metabolismo Intermediario y en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias, lo que respalda la hipótesis de que la evaluación clínica y genética en combinación con marcadores bioquímicos consistentes es una herramienta indispensable para el diagnóstico de pacientes con este tipo de patologías ³⁷².

Aunque el diagnóstico molecular de sospecha de enfermedad mitocondrial ha evolucionado rápidamente en los últimos años, la complejidad en reconocer fenotipos clínicos asociados a esta patología sigue siendo evidente ³⁷³. Puede haber varias razones para esta dificultad, como la heterogeneidad de los síntomas que son difíciles de combinar en un diagnóstico único y la amplia gama de síntomas iniciales que tienden a ser inespecíficos. En este trabajo, el panel de enfermedades mitocondriales es el que presenta la tasa de diagnóstico más baja, de 14,79%, entre los ECM. Este valor está entre el 7% - 31% de tasas de diagnóstico que han sido descritas en la literatura con respecto al estudio de enfermedades mitocondriales por panel genético ³⁷⁴. Las enfermedades mitocondriales son uno de los grupos donde es más difícil obtener un diagnóstico molecular debido a la gran heterogeneidad fenotípica presentada por los pacientes, donde pueden tener afectados las funciones motoras, sensoriales, gastrointestinales, endocrinas, neurológicas y cardiovasculares ³⁷⁵. La variación fenotípica en este tipo de enfermedades se puede deber a defectos en el ADN nuclear (nADN) o en el ADN mitocondrial (mtADN) donde puede haber variaciones en la cantidad y distribución de mitocondrias disfuncionales en todo el cuerpo del individuo. Estas interacciones entre ambos genomas deben ser analizadas con precaución, principalmente

en la interpretación de la frecuencia de variantes, como el caso presentando anteriormente, el paciente 362 con una variante en *EARS2*. Para defectos en el mtADN, el fenotipo va a depender de los tejidos específicos que contienen mitocondrias anormales, la proporción de mitocondrias anormales dentro de estos tejidos y el número de copias de ADNmt mutante dentro del tejido (fenómeno conocido como heteroplasmia). En defectos del nADN, el fenotipo es impulsado por la dependencia de ese tejido a la respiración mitocondrial y la expresión específica de una proteína o de otras proteínas potencialmente compensatorias en un dado tejido. Además, portadores de las mismas variantes pueden tener expresiones de enfermedad distintas, como el caso presentado en este trabajo, paciente 43 y su hermano, ambos con variantes patogénicas en *FOXRED1* pero con severidad clínica diferente. La enfermedad mitocondrial a menudo se sospecha en la primera infancia, y los métodos de diagnóstico tradicionales incluyen presentación clínica, antecedentes familiares, patología, perfil metabólico, niveles de actividad enzimática, electrofisiología, resonancia magnética (MRI), espectroscopía de resonancia magnética (MRS) y análisis de ADNmt. En ocasiones es de gran ayuda la biopsia muscular. A pesar de este arsenal de métodos, el diagnóstico para la identificación de este tipo de patologías continúa siendo difícil.

El panel de hipo/hiperglucemia fue uno de los que ha presentado una de las tasas de diagnóstico positivo más bajas, cerca de 18,60%. Aunque la hipo/hiperglucemia es común en la práctica clínica, la etiología de estos eventos espontáneos sigue siendo difícil de descifrar debido a que muchas veces los defectos no influyen directamente en el metabolismo de la glucosa, sino que están asociados a otras patologías metabólicas. En estos casos, el gen causal de la enfermedad posiblemente no estaría incluido en el diseño del panel.

5.1.1.2. Enfermedades Neurológicas

Dentro de las enfermedades de neurodesarrollo el panel de neuromusculares fue de los que obtuvo mayor tasa de diagnóstico, 36,90%. Este resultado confirma que las características clínicas, las imágenes y biopsias musculares pueden sugerir un diagnóstico específico, pero el diagnóstico final se basa en la identificación de variantes en los genes que pueden ser causales de enfermedad. Además, algunos pacientes son evaluados en una etapa muy temprana de su enfermedad, lo que puede condicionar los detalles de su curso clínico que pueden no estar disponibles aún y la patología muscular puede proporcionar información limitada. En estas circunstancias, puede ser difícil enfocar en una categoría de enfermedad neuromuscular específica para el análisis de un solo gen o algunos genes como en epilepsia. Por lo tanto, el análisis exhaustivo de NGS de todos los genes relacionados con enfermedades neuromusculares proporciona una gran rentabilidad diagnóstica.

Los paneles de epilepsia y defectos de la morfogénesis cerebral fueron de los que tuvieron tasas de diagnóstico más elevadas, dentro de las enfermedades de neurodesarrollo, de 23,5% y 25,4%, respectivamente. Aunque bastante heterogéneas, la base genética de estas enfermedades ha sido desvelada a lo largo de los últimos años permitiendo la identificación y asociación de genes específicos a determinadas patologías. Sin embargo, la tasa de diagnóstico no concluyente en el panel de epilepsia, de 29,7%, es de las más elevadas, debido al gran número de variantes de significado incierto identificadas y a la falta de evidencia de segregación de la enfermedad por falta de confirmación de estudio de portador en la familia. Lo mismo ocurre en el panel de enfermedades neuromusculares con una tasa de 32,1%. Los paneles de discapacidad intelectual y trastornos de movimiento han resultado en tasas de diagnóstico más bajas de lo que viene siendo descrito en la literatura, de 4,8% y 10,3%, respectivamente, siendo los paneles, después del panel de enfermedades mitocondriales, con mayor tasa de diagnóstico negativo.

En conclusión, las evaluaciones clínicas en combinación con biomarcadores consistentes son herramientas útiles para aumentar el rendimiento diagnóstico en pacientes con ECM. En estos casos, el uso

de paneles de genes específicos investigados por NGS es altamente productivo y rentable. Los pacientes sin biomarcadores específicos representan más complejidad. Por otra parte, si las patologías están bien caracterizadas a nivel molecular, la falta de biomarcadores específicos no influye en la identificación del defecto molecular subyacente. Sin embargo, el enfoque del panel NGS arroja resultados importantes y puede ayudar a distinguir a aquellos pacientes que requieren más investigación con un enfoque adicional de secuenciación del genoma / exoma.

5.1.2. Tasa de diagnóstico: Paneles, NeuroExoma y Paneles+NeuroExoma

En una fase inicial los análisis genéticos se centraron en genes conocidos y relacionados con la enfermedad. Solo las regiones codificantes de estos genes particulares están enriquecidas por las sondas respectivas y posteriormente secuenciadas dentro de lo que se conoce como paneles de genes. Al reducir el número de regiones a examinar, se puede lograr una cobertura mucho más profunda para cada nucleótido interrogado. Esto reduce los falsos positivos y negativos y permite la detección de variantes de mosaico y una detección de CNV mucho más potente. Además, los análisis del panel de genes no revelan hallazgos no relacionados con el fenotipo que se investiga, evitando hallazgos incidentales y problemas éticos. Lo más importante de todo es la reducción significativa en los tiempos de respuesta, que han impulsado la difusión de estas herramientas en los centros de referencia de enfermedades raras. Sin embargo, como fue descrito anteriormente, las tasas de diagnóstico de algunos paneles genéticos asociados a determinadas patologías siguen siendo bajas. Así, a lo largo de este trabajo, se ha diseñado un panel que incluye todos los genes asociados a los ECM y enfermedades neurológicas, el NeuroExoma. Con esto se pretendió, por una parte, liberar al clínico de la problemática de escoger un panel específico limitando la posibilidad de encontrar el defecto molecular subyacente, principalmente en las patologías con solapamiento clínico, y por otra parte, ha permitido evaluar de nuevo a los pacientes estudiados inicialmente por paneles genéticos y en los

cuales no fue posible determinar la causa genética de su patología (análisis Panel + NeuroExoma).

Aunque la estrategia de análisis fue cambiando, los resultados demuestran que la tasa de diagnóstico no varía mucho entre el uso de paneles (24%) y NeuroExoma (24%). Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura donde la tasa de diagnóstico basada en pruebas genéticas NGS varían entre el 25% y 52% ¹⁴³. El análisis de un panel genético específico y posterior reanálisis por NeuroExoma ha incrementado la tasa de diagnóstico al 33%.

Las tasas de diagnóstico relativamente similares tanto de paneles y NeuroExoma pueden ser debidas a que, aunque el NeuroExoma incluye un mayor número de genes asociados a diversas patologías, las regiones codificantes de los genes que se están analizando siguen siendo las mismas que las de los paneles. Esto implica que, aunque aumente la complejidad en la detección de variantes implicadas en la enfermedad en el NeuroExoma, en realidad el análisis es similar, ya que el conocimiento de la arquitectura genética de estos trastornos es la misma para diseñar los paneles y el NeuroExoma.

La reanálisis de pacientes no diagnosticados por paneles se hizo a través del NeuroExoma y se ha detectado que en la mayoría de ellos el defecto molecular estaría localizado en un gen que o no estaría aún incluido en el panel inicial porque fue descrito más tarde, o bien porque el gen causal estaba de hecho incluido en otro panel que no el que había sido solicitado inicialmente para estudio. De los 42 pacientes reanalizados con sospecha de enfermedad mitocondrial, fueron identificadas variantes patogénicas en genes asociados a epilepsia (9 pacientes), discapacidad intelectual (4 pacientes) y en 3 pacientes el gen responsable por la patología no había sido incluido previamente en el panel de enfermedades mitocondriales. De los 26 pacientes analizados inicialmente por el panel de epilepsia, se ha verificado que en 12 de ellos el gen causal de la patología estaría incluido en otro panel: mitocondrial (3 pacientes), discapacidad intelectual y morfogénesis

cerebral (4 pacientes) y en 6 de ellos los genes causales habían sido descritos posteriormente al diseño del panel.

5.2. LIMITACIONES

A pesar de sus enormes ventajas y potencial, las tecnologías NGS también presentan limitaciones. En primer lugar, la NGS proporciona una cobertura horizontal y tasas de precisión <100%, lo que puede resultar en fallos en la detección de variantes y en falsos positivos. Otro desafío está relacionado con el filtrado y la interpretación de los resultados, ya que generalmente se encuentra más de una variante candidata. De hecho, cuanto mayor sea el número de kilobases secuenciadas, mayores serán las posibilidades de encontrar variantes candidatas y mayor será la probabilidad de encontrar desafíos éticos relacionados con hallazgos incidentales y cómo guiar a los pacientes o familiares no afectados. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de definir estándares para la calidad de ejecución, interpretación de variantes y control de calidad. A continuación, se describen las limitaciones y desafíos más relevantes para el análisis de la información genética.

5.2.1. Demostración de causalidad de una variante

Cuando se está buscando un diagnóstico molecular y se encuentra una o varias variantes posiblemente patogénicas en un gen conocido que está asociado con un fenotipo similar al del paciente que se está estudiando y tiene un modo de herencia apropiado basado en los antecedentes familiares (*de novo* para un trastorno dominante con padres sanos, cosegregación de la variante para un trastorno familiar dominante o variantes trans en un gen recesivo), es muy probable que se esté cerca de un diagnóstico molecular definitivo. Sin embargo, cuando la variante identificada se encuentra en un gen que no haya sido asociado con una enfermedad específica o en un gen previamente asociado con un fenotipo diferente, entonces nos enfrentamos a una situación problemática a nivel de análisis e interpretación. Es muy difícil demostrar la causalidad de cualquier variante en un gen nuevo

cuando solo hay un individuo afectado. Si bien encontrar variantes raras que pueden ser perjudiciales en un estado heterocigoto compuesto o *de novo* puede ser un buen primer paso para vincular un gen a una enfermedad, en última instancia, los estudios funcionales, las familias, la co-segregación y otros análisis genéticos son esenciales para apoyar la patogenicidad de las variantes.

5.2.2. Expansión de trinucleótidos

Existe un grupo de trastornos neurogenéticos conocidos en los que la base molecular de la enfermedad involucra la expansión de repeticiones de trinucleótidos, como la enfermedad de Huntington, la distrofia miotónica de Steinert, las ataxias espinocerebelosas, o el síndrome de X frágil la ataxia de Friedreich. Las repeticiones ampliadas van desde pequeñas expansiones de 20 a 100 copias hasta expansiones de varios miles de unidades. La mayoría de las tecnologías NGS se basan en la lectura de señales de secuencias de ADN, y están limitadas por la pérdida de coherencia de lectura de la secuencia de ADN, (un problema particular de secuencias ricas en GC), así como por la disminución de la resolución de tamaño al aumentar la longitud del ADN³⁷⁶. Debido a la corta longitud de las lecturas, la tecnología NGS es, al menos por el momento, incapaz de detectar expansiones de trinucleótidos. Sin embargo, la tecnología de secuenciación de tercera generación puede superar esta limitación. SMRT, secuenciación en tiempo real de una sola molécula, utiliza una guía de onda de modo cero (una única molécula de ADN) como plantilla³⁷⁷ y las lecturas de secuenciación solo están limitadas por la pérdida de actividad de las moléculas de polimerasa individuales. Las longitudes de lectura pueden ser tan altas como 15 kb (promedio de 3 kb)³⁷⁸. En un estudio sobre la aplicación de la tecnología SMRT, Loomis y sus colegas determinaron que era posible generar datos de secuencias para el gen *FMRI* (el gen humano del retraso mental X frágil 1) que contiene en sus alelos un exceso de 750 repeticiones CGG³⁷⁹.

5.2.3. No detección de variantes en regiones codificantes

5.2.3.1. Exones ricos en GC

En términos de eficiencia de captura, hay un subconjunto importante de exones ricos en GC de los genes codificantes que se pierden en el análisis por NGS. En consecuencia, las variantes causales de la enfermedad presentes en estas regiones se perderán, produciendo un resultado de falso negativo. Debido a que con frecuencia hay más que un gen candidato, la falta del gen causal puede llevar a resultados de falsos negativos y falsos positivos.

5.2.3.2. Regiones altamente homólogas

Los déficits de cobertura generados por la presencia de regiones altamente homólogas son otra limitación de la tecnología NGS. Aunque estas regiones son capturadas y cubiertas por múltiples lecturas, los filtros de control de calidad las descartan porque la misma lectura se puede alinear en múltiples regiones diferentes. Por lo tanto, se pueden producir caídas de cobertura y las variantes presentes en esas regiones. La alineación sin filtrado de QC puede usarse para no eliminar estas lecturas y detectar variantes, aunque en tal caso no será posible determinar la región específica a la que pertenece una determinada variante. Este problema podría resolverse a medida que la longitud de lectura aumenta progresivamente. En la actualidad, las duplicaciones se pueden resolver amplificando solamente cada región específica usando primers específicos colocados en un sitio no homólogo en el borde de la región de interés, y luego, secuenciando cada amplificación por Sanger usando primers internos o por NGS usando una biblioteca específicamente preparada con la PCR sin ninguna captura adicional.

5.2.4. Limitaciones bioinformáticas

Los algoritmos computacionales utilizados en todas las etapas del proceso de secuenciación, ya sea en la alineación, llamada de variantes

o anotación, aún están sujetos a una optimización. Los diferentes paquetes de software disponibles en la actualidad pueden llevar a interpretaciones distintas, diferentes umbrales para la significación estadística y la llamada de variantes produciría una lista final diferente de genes relevantes.

5.2.5. Variantes perdidas en regiones no codificantes

La mayoría de las herramientas de NGS se limitan principalmente a regiones codificantes conocidas del genoma humano, con excepción del WGS. Las secuencias de exoma representan solo aproximadamente el 2% del genoma y, por lo tanto, tiene sentido que se pierdan muchas variantes potencialmente asociadas a enfermedad. Así, con los estudios habituales se pueden perder regiones potenciales de *splicing* debido a las limitaciones de los algoritmos de predicción *in silico* o porque se encuentran en regiones no codificantes no secuenciadas. Los cambios en las variaciones del sitio de *splicing*, la región 3' reguladora no traducida, los ARN no codificantes y la interacción directa de los factores de transcripción pueden tener efectos significativos en los patrones de expresión génica que solo pueden evaluarse mediante el análisis del transcriptoma.

Al aplicar NGS a ADN y ARN simultáneamente, podemos buscar posibles variantes que causan enfermedades en el ADN no codificante y, al mismo tiempo, conocer las implicaciones funcionales de los cambios genómicos con el beneficio adicional de aprender sobre la transmisión de alelos y el posible desequilibrio en la expresión del cromosoma X debido a la inactivación del cromosoma X sesgada. Tal enfoque puede revelar correlaciones genotipo-fenotipo, resaltar los perfiles de expresión génica asociados con la condición genética que se está estudiando y permitir la evaluación inmediata mediante algoritmos de predicción *in silico* del efecto que las variantes genómicas tienen sobre la expresión génica, el *splicing* alternativo, el uso de exones y fusión de genes ³⁸⁰. Por otra parte, a menudo las enfermedades monogénicas raras pueden verse como problemas de dosificación de la proteína producida causados por niveles suprafisiológicos o

infrafisiológicos del producto génico funcional, que generalmente altera la actividad de las proteínas. Para los pacientes en los que el test genético no es informativo, la secuenciación de ARN (RNA-seq) ha demostrado utilidad diagnóstica en enfermedades Mendelianas^{381,382}. En un trabajo publicado en 2019, han estudiado a 94 pacientes con enfermedades raras no diagnosticadas y han desarrollado un enfoque de análisis de datos de RNA-seq demostrando los impactos de las estrategias de expresión, empalme, filtración de genes y variantes en la identificación de genes asociados a la enfermedad, donde han obtenido una tasa de diagnóstico final del 7,5%, la cual podría subir a 16,7% debido a la identificación de genes candidatos³⁸³.

5.2.6. Variantes perdidas en el mosaicismo somático

Se ha mencionado anteriormente que uno de los logros con el uso de NGS fue el descubrimiento del importante papel que juegan las variantes en mosaico en el desarrollo de enfermedades raras. Sin embargo, las tecnologías NGS solo pueden detectar variantes en mosaico si: 1) la prueba consigue una alta cobertura y 2) si la variante somática está presente en las células sanguíneas, ya que el análisis genético generalmente se realiza con ADN extraído de estas células. Sin embargo, incluso las variantes en mosaico presentes en el tejido sanguíneo pueden ser difíciles de detectar porque el material genético resultante es inestable debido a los múltiples ciclos de autorrenovación a las que se somete durante la hematopoyesis. Además, la diversidad de líneas clonales que dan lugar a las células sanguíneas circulantes disminuye con la edad.

En las enfermedades del neurodesarrollo, donde las variantes solo pueden estar presentes en los tejidos de origen ectodérmico, el mayor desafío para detectar el mosaicismo radica en estudiar el tejido afectado en el que está presente la variante. Para superar estas limitaciones, se debe investigar el uso de otras fuentes de ADN para análisis genéticos (por ejemplo, células bucales, raíces capilares, fibroblastos de la piel) e

implementar y optimizar estos enfoques como herramientas clave en los análisis genéticos de rutina.

5.2.7. Variantes epigenéticas perdidas

Las modificaciones epigenéticas proporcionan un sistema de regulación génica que permite alteraciones clonables hereditarias pero reversibles en la transcripción génica. Los errores en este sistema complejo pueden dar lugar a un silenciamiento genético anormal, conocido como epimutación (esto puede ocurrir en ausencia de un defecto genético subyacente) ³⁸⁴. Las epimutaciones son eventos somáticos comunes, y son particularmente frecuentes en los tumores, pero Suter y otros ^{385,386} han demostrado que también pueden surgir en la línea germinal, dando lugar al silenciamiento transcripcional de un gen. Una epimutación de la línea germinal puede imitar el efecto de una variante inactivadora, y al hacerlo, la fenocopia conlleva a una enfermedad genética. Las tecnologías NGS disponibles (paneles, WES y WGS) no pueden detectar procesos epigenéticos. Otras tecnologías ortogonales como RNA-seq o CHIP-seq pueden detectar fusiones de genes, diferencias de expresión o cambios en las regiones reguladoras que se pierden con la secuenciación del exoma. Solo el análisis transcriptómico del tejido afectado podría revelar este tipo de variación genética. De hecho, en 2017 se ha publicado un estudio donde se han secuenciado RNA para evaluar a pacientes con trastornos musculares no diagnosticados. Con este enfoque, los autores pudieron proporcionar un diagnóstico para cerca de 35% de sus pacientes, lo que sugiere su utilidad potencial para la evaluación genética clínica ³⁸⁷.

5.2.8. Influencia de otros mecanismos desconocidos

En las enfermedades raras los fenotipos muchas veces no son consistentes con el fondo genético de un paciente, sino que pueden variar según por influencia de otros mecanismos desconocidos. En este trabajo la tasa de pacientes no diagnosticados ha variado entre el 35%, en el caso del análisis por el NeuroExoma, aunque este valor podría

aumentar debido al elevado número de casos no concluyentes, 47% en el caso del análisis por panel más reanálisis por NeuroExoma, y de 56% en el análisis por panel. Generalmente se supone que los ECM y enfermedades neurológicas son causadas por mecanismos de herencia mendeliana, y que eventualmente todos los pacientes serían diagnosticados mediante la identificación de una variante causal en un gen. Sin embargo, esto no siempre sucede. Incluso con la secuenciación completa del genoma, sigue habiendo una laguna en el diagnóstico y no se encuentra el defecto causal de su patología. Esto en parte es debido a que, aunque se expanda el estudio a toda la información genética que compone un individuo, el foco de la interpretación de los datos sigue siendo lo que se conoce y lo que me permite una interpretación fiable de la patogenicidad de las variantes identificadas ³⁸⁸. Así, el objeto real del análisis de un WGS son las regiones codificadoras y reguladoras, como el WES, y la tasa de diagnóstico entre ambas técnicas es similar, 42% y 40% respectivamente. ^{143,389}.

Por otro lado, nos podríamos plantear que algunas enfermedades mendelianas o monogénicas son en realidad enfermedades complejas o poligénicas, donde la patología es causada por la combinación de variantes raras y comunes ³⁹⁰, como sucede en algunas neuropatías. En un estudio publicado en 2015 se observó que el aumento de la carga mutacional en los genes de neuropatía era consistente con un mecanismo de interacción genética positiva de la herencia oligogénica que determina la enfermedad ³⁹¹.

La percepción de que la expresión fenotípica para los trastornos mendelianos está impulsada por variantes en un solo locus está siendo reevaluada por la influencia de otro mecanismo como son los modificadores genéticos. Aunque existen varios tipos de modificadores, la definición simple asociada es la del efecto de un alelo en el resultado fenotípico de un segundo alelo ³⁹². Si el alelo primario es suficiente para causar la enfermedad, entonces el alelo secundario es un modificador que modula la expresión fenotípica, como la gravedad o la progresión de la enfermedad. Un ejemplo de esto es en el caso de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth tipo 1A, donde recientemente fue

identificado el polimorfismo miR-149 se ha asociado con la edad de inicio y la gravedad de esta patología³⁹³.

5.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

5.3.1. Farmacogenómica

La farmacogenética se refiere a la influencia de determinadas variantes de ADN en la respuesta a un fármaco, cuyo conocimiento puede facilitar la selección de la medicación, la dosis y la duración del tratamiento y evitar reacciones adversas al fármaco³⁹⁴. Se han descrito además estudios sobre las diferencias en la respuesta al tratamiento entre niños y adultos³⁹⁵. Estos incluyen diferencias en el metabolismo del fármaco y la expresión génica, siendo este último un proceso altamente dinámico que funciona desde el período neonatal durante la infancia hasta la vida adulta. Aunque el número de estudios dedicados específicamente a la población pediátrica aún es limitado en comparación con los adultos, se está identificando un número creciente de genes en los que las variantes influyen en el tratamiento farmacológico de las enfermedades infantiles^{396,397}.

La identificación de variantes en genes nuevos, así como la validación de sus efectos funcionales aumentará aún más la capacidad de predecir la respuesta al tratamiento farmacológico en niños; al mismo tiempo, la implementación clínica de este conocimiento exigirá un enfoque de diagnóstico eficiente para identificar primero un perfil farmacogenómico en un paciente individual en un corto período de tiempo, junto con pautas clínicas basadas en evidencia para facilitar la toma de decisiones basada en el genotipo³⁹⁸. La introducción de las tecnologías NGS revolucionó las herramientas moleculares de detección de variación genética. El aumento de las capacidades tecnológicas y la disminución de los costes involucrados en dicho análisis han resultado en la implementación cada vez con más éxito de la secuenciación del exoma como herramienta de investigación clínica, particularmente para identificar genes nuevos asociados a

enfermedades raras. Debido a este suceso, estas técnicas de detección empiezan a abrir paso lentamente como una herramienta de diagnóstico. En un campo como la farmacogenética, en que diferentes variantes en diferentes genes influyen en la respuesta final al fármaco en un paciente individual, tales técnicas de secuenciación pueden proporcionar la rapidez necesaria en un determinado entorno clínico. Este cambio ha inducido una evolución de la farmacogenética a la farmacogenómica. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad PKU, se ha vinculado el genotipo con un determinado fenotipo bioquímico y farmacológico donde (1) la actividad residual de fenilalanina por debajo del 3,5% se asoció con la fenilcetonuria clásica que no respondía al tratamiento farmacológico; (2) la falta de actividad máxima definida indujo la pérdida de respuesta a la tetrahidrobiopterina; (3) una mayor necesidad de cofactor se relacionó con fenotipos clínicos inconsistentes y bajas tasas de respuesta a la tetrahidrobiopterina; y (4) actividad residual superior al 5%, un pico de actividad definido y una necesidad de cofactor normal se asociaron con fenotipos leves y tratables farmacológicamente³³³.

5.3.2. Translación del WGS a la clínica

Aunque se hicieron bastantes avances en la translación de las tecnologías NGS en la práctica clínica para entender la base molecular que subyace a los ECM y los trastornos neurológicos, muchos pacientes con enfermedades hereditarias raras no reciben un diagnóstico molecular, como se ha verificado en el 56% de los casos no diagnosticados en este trabajo, una cifra que sigue siendo bastante elevada.

El WGS se está incorporando a la rutina clínica para mejorar el diagnóstico genético de las enfermedades raras. Sin embargo, la cantidad de información es enorme y la interpretación de las variantes genéticas es difícil, y establecer la validación clínica de una nueva variante patogénica candidata es complejo y requiere estudios de segregación familiar, estudios de pacientes no relacionados entre sí

pero con fenotipos similares y estudios funcionales laboriosos. Se han iniciado varias iniciativas de investigación con WGS en Oxford que precedieron al Proyecto 100000 Genomes: WGS500, una iniciativa iniciada en 2011 para secuenciar 500 genomas de pacientes y familiares con diversas enfermedades raras ³⁹⁹.

En un estudio reciente, se analizaron 79 pacientes de 16 familias independientes para la secuenciación del genoma completo en un esfuerzo por identificar las variantes causales de 16 enfermedades raras distintas que son en gran medida clínicamente intratables. Como resultado, obtuvieron una tasa de diagnóstico del 62,5% (Liu *et al.*, 2019). En otro estudio publicado en 2018, la aplicación de la WGS para el diagnóstico de enfermedades raras pediátricas obtuvo una tasa de diagnóstico de 43% ¹²⁶. La diferencia entre ambos estudios y que explica la diferencia en las tasas de diagnóstico, es que Liu hizo también un análisis retrospectivo a partir del análisis primario por WGS, aumentando el número de variantes identificadas y que no habían sido filtradas en el pipeline inicial. Por otro lado, se verifica que cerca del 80% de las variantes identificadas por WGS están localizadas en regiones codificadoras (Liu *et al.*, 2019), fácilmente detectado por WES y a un coste inferior que el WGS.

A pesar de la enorme cantidad de información genética obtenida por WGS, esta tecnología se está convirtiendo en una herramienta poderosa para el diagnóstico de enfermedades raras, principalmente en los casos donde el análisis por panel o WES fue negativo.

5.3.3. Genética en el cribado neonatal

Las enfermedades raras a menudo se presentan en los primeros días o semanas de vida y pueden requerir un manejo complejo en el contexto de una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Tanto el rendimiento diagnóstico como la rapidez son consideraciones importantes en la atención neonatal. La premisa fundamental es que la aplicación temprana de las tecnologías NGS puede tener un alto

impacto clínico. Estudios han demostrado cómo la adopción de esta tecnología como primer nivel para el diagnóstico genético de los recién nacidos enfermos graves aumenta la tasa de diagnóstico y reduce el tiempo de diagnóstico, mejorando los resultados y reduciendo los costos de salud ^{126,401}

En 2015 se han reportado algunos estudios de implementación genómica en UCIN. El Children's Mercy Hospital Kansas City, por ejemplo, aplicó WGS a una población selecta de bebés enfermos en una UCIN de nivel IV. Se ha identificado una enfermedad genética causal en el 57% de los pacientes, en comparación con solo el 9% cuando se utilizaron pruebas genéticas estándar ⁴⁰². La mayoría de los diagnósticos han llevado a cambios en el manejo clínico de los pacientes y en 65% de ellos fueron asociados con variantes *de novo*. La UCIN en el Hospital Children's Hospital of Eastern Ontario utilizó un panel de genes clínicamente relevantes para evaluar a 20 recién nacidos, 8 de los cuales recibieron un diagnóstico ⁴⁰³. Los autores describieron que tal enfoque altera la prestación de la atención médica en estas unidades y que incluso una tasa de éxito del 10-20% es invaluable si permite una ventana de intervención que de otra manera sería inexistente.

Estudios más recientes, han obtenido tasas de diagnóstico de 21% por el uso del WGS en el estudio de pacientes neonatales y pediátricos con sospecha de enfermedad genética rara ⁴⁰⁴, en otro estudio se ha descrito una tasa de diagnóstico de cerca del 31% ¹²⁹.

Otro proyecto desarrollado, fue el del BabySeq, llevado a cabo por Robert Green del Hospital Brigham and Women, Alan Beggs de la Facultad de Medicina de Harvard y sus colegas. Han reclutado familias y asignaron al azar a la mitad de ellos para que se secuenciaron los genomas de sus bebés. La cohorte de este estudio incluía bebés sanos pero también bebés enfermos ingresados en la UCI neonatal. Desarrollaron una lista de aproximadamente 1,500 genes que estaban altamente asociados con enfermedades que comienzan en la infancia o la adolescencia. El objetivo era hacer las pruebas más completas posibles: ver cualquier cosa y todo lo que se pudiera descubrir sobre los

riesgos basados en genes. Se ha verificado que el 9.4 por ciento del grupo sano corría el riesgo de desarrollar una enfermedad de inicio en la infancia que no se conocía por su historial médico o familiar, y el 88 por ciento eran portadores de enfermedades recesivas ¹³².

Debido a que la progresión de la enfermedad es extremadamente rápida, aunque heterogénea, en los recién nacidos, los diagnósticos moleculares deben ocurrir rápidamente para ser relevantes para la toma de decisiones clínica.





6. CONCLUSIONS

1. The gene panels developed in this study presented a diagnostic rate that varied between 58.33% obtained using the intermediate metabolism diseases panel and 4.8% obtained using the intellectual disability panel.
2. The diagnostic rates of the different panels were not correlated with the number of genes included in each one, but with the genetic heterogeneity associated with each group of diseases, as well as the specificity of the symptoms that motivated the study. Thus, in the case of the epilepsy panel, genetic performance is based on a small group of well characterized genes: *SCN1A*, *KCNQ2*, *CDKL5*, *FOXG1* and *SCN2A*. While in the case of panels associated with intermediate metabolism and complex molecule defects, high diagnostic performance is based on the existence of disease-specific biochemical markers that guide the diagnosis.
3. The overall diagnostic rate of the Neuroexome panel was not higher than that obtained through the use of individual gene panels, although it proved to be useful in the reanalysis of patients not diagnosed under the study of gene panel. Thus, this type of genetic diagnosis strategy is recommended when the study by a gene panel has been negative or when the clinical presentation of a patient does not allow establishing a clear diagnostic suspicion.
4. In the majority of cases in which a genetic diagnosis could not be established despite the identification of variants potentially associated with the patient's symptoms, the cause was the impossibility of carrying out the segregation study in the parents, highlighting the importance of these studies in the interpretation of genetic studies results.

CONCLUSIONS

5. Possible cases of mosaicism have been detected in patients with congenital errors of metabolism or neurological diseases, mostly in patients with a clinical diagnosis of epilepsy, and especially in those with variants in genes that code for sodium channels (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN9A*). These results point towards the need to rule out the presence of somatic mosaicism in those cases in which a pathogenic variant associated with a dominant inheritance pattern is identified in an unaffected parent, especially in neurological diseases.
6. The findings found by using the epilepsy panel support the existence of a common etiology for this group of diseases, associated with defects in voltage-dependent ion channels, suggesting that defects in the function of the encoded protein, rather than the haploinsufficiency, is the molecular mechanism behind its pathophysiology.
7. Recurrent variants were identified in our population: c.533G>A (p.Arg178His) in the *HEXA* gene, c.782G>A (p.Arg261Gln) in the *PAH* gene, c.1117G>A (p.Gly373Arg) in the *PIK3R2* gene, c.649dupC (p.Arg217fs) in the *PRRT2* gene. The identification of recurrent variants in the study population is essential by allowing their classification as disease-cause variants. This helps to simplify the final diagnosis of these pathologies making easier their identification and interpretation.
8. The functional studies carried out in this work have allowed the classification as pathogenic the following variants: c.920G>A (p.Gly307Glu) and c.733 + 1G>A identified in *FOXRED1*, as well as the c.670G>A (p.Gly224Ser) and c.376C>T (p.Gln126*) identified in *EARS2*, demonstrating the mitochondrial dysfunction associated with these changes. Functional studies are, in many cases, the only way to definitively establish the pathogenicity of a variant and, therefore, they are a fundamental tool for the use of diagnostic genomic tools.



7. ARTÍCULOS PUBLICADOS



Article

Identification and Characterization of New Variants in *FOXRED1* Gene Expands the Clinical Spectrum Associated with Mitochondrial Complex I Deficiency

Sofia Barbosa-Gouveia ^{1,2,3,*}, Emiliano González-Vioque ^{1,3}, Filipa Borges ¹, Luis Gutiérrez-Solana ⁴, Liesbeth Wintjes ⁵, Antonia Kappen ⁵, Lambert van den Heuvel ⁵, Rosaura Leis ^{3,6,7}, Richard Rodenburg ⁵ and Maria Luz Couce ^{1,2,3,8}

- ¹ Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases Unit (UDYTEMC), Department of Pediatrics, Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
 - ² Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
 - ³ IDIS-Health Research Institute of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
 - ⁴ Unit of Child Neurology, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, 28009 Madrid, Spain
 - ⁵ Department of Paediatrics, Radboud Centre for Mitochondrial Medicine, Radboud University Medical Centre, 6525 GA Nijmegen, The Netherlands
 - ⁶ Unit of Pediatric Gastroenterology and Nutrition Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
 - ⁷ CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
 - ⁸ CIBERER, Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: sofiasbg@gmail.com; Tel: +34-981-950-100

Received: 25 July 2019; Accepted: 15 August 2019; Published: 20 August 2019



Abstract: Complex I (nicotinamide adenine dinucleotide (NADH): ubiquinone oxidoreductase) is the largest complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) system. Forty-four subunits encoded in nuclear and mitochondrial genomes compose this multiprotein complex, its assembly being a highly complex process involving at least 15 additional nuclear encoded assembly factors. Complex I deficiency is a mitochondrial disorder usually associated with early-onset severe multisystem disorders characterized by highly variable clinical manifestations. Flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1 (FOXRED1) is a complex I assembly factor. To date, only five patients with mitochondrial complex I deficiency due to mutations in *FOXRED1* have been characterized. Here, we describe a child with ataxia, epilepsy and psychomotor developmental delay carrying two heterozygous *FOXRED1* variants, c.920G>A (p.Gly307Glu) and c.733+1G>A. We demonstrate the molecular mechanism supporting the pathogenicity of the FOXRED1 variants, showing a clear deficiency of complex I activity. The reduction in the steady-state level of complex I holoenzyme in patient fibroblasts, confirmed the pathogenicity of the variants and showed the molecular mechanism behind their pathogenicity. A comparison of the clinical presentation of the index case with the previously described cases allowed deepening our knowledge about the clinical variability associated with *FOXRED1* defects.

Keywords: mitochondrial disorders; complex I deficiency; FOXRED1; epilepsy

1. Introduction

Mitochondrial diseases (MDs), caused by defects in the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS), are one of the most common inborn errors of metabolism with a birth prevalence of

1/5000 [1,2]. Among these, complex I deficiency (MIM #252010) is the most common defect, accounting for 1/3 of all cases [2].

The OXPHOS system, composed of five multi-subunit enzyme complexes and two electron carriers (ubiquinone and cytochrome *c*), is the main cellular source of energy through ADP phosphorylation to ATP using the electrochemical proton gradient generated by electron transport [3]. Mitochondrial complex I, the major entry point for electrons to the respiratory chain [4], is the first and largest complex of the OXPHOS system [5], and it consists of 44 different subunits codified by nuclear and mitochondrial genes [6,7]. This complex plays a central role in energy metabolism: it has been implicated in the regulation of reactive oxygen species (ROS) and is suggested as the rate-limiting step in overall respiration [4]. Complex I assembly is proposed to involve a stepwise process with intermediate complexes shared by two assembly pathways: *de novo* synthesis headed by mtDNA-encoded subunits and the dynamic exchange of newly imported nDNA-encoded subunits with pre-existing components of the mature complex [8–10].

The complicated assembly of so many subunits requires a number of assembly factors that are not part of the final structure of complex I. Currently, at least 15 known or putative complex I assembly factors have been described and variants in nine of these were associated with isolated complex I deficiency due to impaired complex I biogenesis [9,11,12]. One of those assembly factors is FOXRED1, a 486-amino acid FAD-dependent oxidoreductase. Initially, phylogenetic profiling and subsequent knockdown studies identified FOXRED1 as a candidate protein for complex I biogenesis [13]. Later, Formosa et al. confirmed its role not only in the assembly but also in the stability of late stages complex I intermediates [14].

Complex I deficiency is involved in early-onset severe multisystem disorders [15,16] and represents the biochemical phenotype for ~30% of mitochondrial disease pediatric patients [16]. The clinical symptoms that arise are usually highly heterogeneous, with a poor prognosis, and rapid progression [17]. To date, only five patients with mitochondrial Complex I deficiency due to mutations in FOXRED1 have been described [18–22]. All the variants identified are located in the same protein domain. Here, we demonstrate the molecular mechanism supporting the pathogenicity of the FOXRED1 variants found in compound heterozygosity in our patient. Also, we compare the particular clinical presentation of the patient with the previously described cases, expanding the phenotype spectrum associated with FOXRED1 defects.

2. Experimental Section

This study was developed in collaboration with the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Spain) and Radboud University Medical Center (Netherlands). Parents have provided written informed consent for study participation and the publication of the results. All experimental protocols were approved by the Radboud University Medical Center and were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

2.1. Clinical Profile

Our index case, Patient 1, a second child from nonconsanguineous parents, showed intrauterine growth restriction (IUGR) from the first trimester of pregnancy. At 2 months, he was admitted to the hospital for bronchiolitis. From that moment, his parents noticed he was less reactive. Magnetic Resonance Imaging (MRI) of the brain was normal. At 3 months of age, the patient began to have paroxysmal episodes and later showed a language delay. At 2 years old, he showed 5/6 episodes per day of “blinking out” for a short period, with or without clonic movements. He was controlled with oxcarbazepine. In the following year, he presented with loss of muscle tone and started to decline. At 4 years old, he showed loss of awareness and responsiveness episodes with a fixed gaze; had clonic movements of the right leg, 30–40 episodes of sudden falling per day and ataxia. Lactic acidosis was present even without exercise. Currently, at 15 years old, the hypomotor episodes are still present.

He has some difficulties adapting to new situations. He is more alert and more responsive but clumsier and more uncoordinated with motor movements (complete clinical history in Supplementary Table S1).

2.2. Targeted Next-Generation Sequencing

The patient's DNA was isolated from lymphocytes and analyzed with targeted next generation sequencing (NGS) panels for mitochondrial diseases. We designed a multi-gene panel consisting of 150 nuclear genes coding for respiratory chain complex subunits and proteins involved in the OXPHOS system function previously reported in the literature.

The genetic data was analyzed through NGS technology consistent in enrichment with an in-solution hybridization technology (Sure Select XT; Agilent Technologies) and subsequent sequencing in the Miseq platform (Illumina). A custom Sure Select probe library was designed to capture the exons and exon-intron boundaries of the targeted genes [23]. Sequence capture, enrichment, and elution were performed according to the manufacturer's instructions. Image analysis and processing of the fluorescence intensities in sequences ("Base Calling") was performed with Real-Time Analysis (RTA) software v.1.8.70 (Illumina), and quality control of the data was developed with FastQC v0.10.1 program. Reads were aligned to the reference genome GRCh37 with BWA v0.7.9a [24]. NGSrich v0.7.5 software [25] was used as a control previous to variant detection, and BEDTools 2.17.0 [26] and Picard 1.114 [27] for intermediate steps. VarScan v.2.3.6 [28] and SAMtools v0.1.19 [29] were the variant detection software used for indels and single nucleotide polymorphisms (SNP), respectively and Annovar for variant annotation [30].

To achieve a reliable clinical interpretation of the variants detected, we applied prioritization criteria to predict their pathogenicity according to American College of Medical Genetics and Genomics (AMCG) guidelines [31].

2.3. Protein Modeling

The *FOXRED1* gene encodes a 486-amino acid FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein. The protein has a cleavable N-terminal mitochondrial targeting sequence which was shown to be localized to the mitochondrion [32] and associated with the matrix face of the mitochondrial inner membrane [14].

The FOXRED1 (Uniprot AC: Q96CU9; ID: FXRD1_HUMAN) protein FASTA sequence was used to build a protein model generated by SWISS-MODEL. The SWISS-MODEL template library (SMTL version 2019-02-28, PDB release 2019-02-22) was searched with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [33] and HHBlits (Markov models (HMMs)-based lightning-fast iterative sequence search) [34] for evolutionary-related structures matching the target sequence. By performing this homology model, we tried to determine how the missense mutation detected in both patients may change the protein structure, which most probably leads to local conformational changes inducing an important impact on its function.

2.4. Cell Culture

Patient and healthy control fibroblasts were cultured in M199 medium (Gibco) supplemented with 10% *v/v* fetal calf serum (FCS) and 1% *v/v* penicillin/streptomycin (Gibco) at 37 °C with 5% CO₂.

2.5. Mitochondrial Isolation

Fibroblast pellets from both patients and control cell lines were resuspended in ice-cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.6. Cells were then disrupted in a Potter-Elvehjem homogenizer at 1800 rpm, and sucrose was added to make the samples isotonic (250 mM). The homogenized cellular samples were centrifugated for 10 min at 600× *g* and the mitochondria pellets were obtained after centrifugation of the supernatant for 10 min at 14,000× *g*.

2.6. Respirometry and OXPHOS Activity

The Seahorse XFe96 Extracellular Flux analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) was used to measure Oxygen Consumption Rate (OCR) and the Extracellular Acidification Rate (ECAR). In the day prior to the assay, control and patient fibroblasts were seeded at 10,000 per well in cell culture medium (M199 supplemented with 10% FCS and 1% pen/strep) and incubated overnight at 37 °C with 5% CO₂. On the assay day, the cell culture medium was replaced by Agilent Seahorse XP Base Medium with 10 mM glucose (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), and 200 mM L-glutamine (Life sciences) and then incubated for one hour at 37 °C without CO₂. Baseline cellular OCR was measured eight times followed by four measurement cycles after the addition of the following inhibitors: 1 μM oligomycin A (Sigma), 2.0 μM and 4.0 μM carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone FCCP (Sigma), and 0.5 μM rotenone and 0.5 μM antimycin A (Sigma), respectively. After OCR measurements, the cell medium was removed and replaced by 0.33% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6). Seahorse plates were stored at –80 °C and thawed afterward. To measure citrate synthase, 3 mM acetyl-CoA, 1 mM DTNB, and 10% Triton X-100 were added. Citrate synthase activity was measured spectrophotometrically, at 37 °C, using a Tecan Spark spectrophotometer. Measurements were based on the absorption at 412 nm by the product thionitrobenzoic acid (TNB), and citrate synthase activity was calculated from the rate of dithionitrobenzoic acid (DTNB) conversion in the presence of oxaloacetate. OCR was measured before and after the addition of inhibitors and normalized to citrate synthase activity according to Srere et al. [35].

The enzymatic activities of complexes I–V, citrate synthase and protein were assayed spectrophotometrically as previously described [36]. All assays were performed in duplicate using a Konelab 20XT auto-analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.7. SDS-PAGE and BN-PAGE Immunoblot Analysis

For the detection of FOXRED1 protein and the native mitochondrial complex I in our patient and control cell lines, SDS-PAGE and blue native page immunoblot analysis were performed, respectively. Mitochondrial fractions from patient and control cell lines were used. For SDS-PAGE, samples were heated and denatured at 70 °C in the presence of β-Mercaptoethanol and separated on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. For blue-native PAGE, the native mitochondrial complexes were solubilized with 2% w/w n-dodecyl β-D-maltoside. A total of 15 μg and 25 μg of solubilized mitochondrial protein were separated on a 6–16% pre-cast Native PAGE Bis-Tris gels (Invitrogen). Subsequently, proteins were transferred to Immuno-Blot Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (0.20 μm Immobilon-P (Millipore IPVH00010)) and immunodetection was performed with the following antibodies: Rabbit polyclonal FOXRED1 antibody (Proteintech:24595-1-AP); CI-NDUFA9 (ab14713, Abcam, Cambridge, UK); CII-SDHA (Ab14715; Abcam, Cambridge, UK); Secondary antibodies goat anti-mouse (P0047; DAKO) and goat anti-rabbit (A00160, Genscript, Piscataway, NJ, USA). The chemiluminescence signal was visualized using the enhanced chemiluminescence kit (ECL, Thermo Fischer Scientific) and the Chemidoc XRS+ system (Biorad, Hercules, CA, USA).

3. Results

3.1. Molecular Genetics and *in Silico* Analysis of FOXRED1 Variants

Through NGS analysis, two compound heterozygous variants in FOXRED1 (NM_017547.3) were identified in our patient (Figure 1). The variant c.920G>A (p.Gly307Glu), previously reported associated with mitochondrial complex I deficiency, and a splicing variant, c.733+1G>A, not reported so far in human genetic variation databases. Segregation studies were performed through Sanger sequencing to determine the inheritance pattern, and the results are shown in Figure 1. The missense variant was inherited from the mother, and the splicing variant was inherited from the father. The patient has an older brother who also inherited both FOXRED1 variants and shows a similar, although milder, clinical

phenotype (clinical history for both patient and brother, patients 1 and 2 respectively, in Supplementary Table S1).

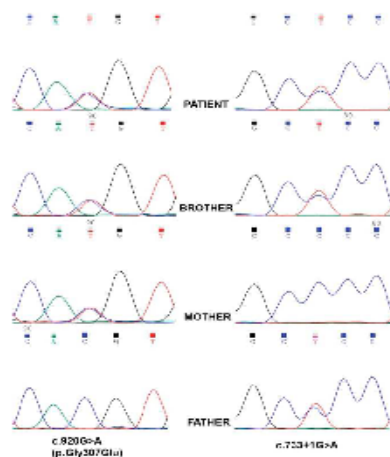


Figure 1. Reverse sequence chromatograms showing Sanger sequencing results. The missense variant c.920G>A (p.Gly307Glu), located in exon 8, was inherited from the mother and the splicing variant, c.733+1G>A, located in intron 6, was inherited from the father. The patient and affected brother harbored both variants in FOXRED1 in a compound heterozygous condition.

The FOXRED1 variants were analyzed *in silico* to determine the evolutionary conservation, predicted pathogenicity, functional consequences and Minor Allele Frequency (MAF) within the population (Supplementary Table S2). According to Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP), PhyloP, and phastCons, both variants are in positions of the FOXRED1 protein which are highly conserved through evolution. Pathogenicity was predicted as disease causing by MutationTaster and damaging by FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models) and DANN (Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks) scores. The missense variant c.920G>A is located in exon 8 and results in an amino acid change from a non-polar glycine to an acidic negatively charged glutamic acid at residue 307 and it was predicted as tolerated by SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) and damaging by Provean. The splicing variant c.733+1G>A, located in intron 6, was predicted to destroy the wild-type splice donor site, thus most probably affecting splicing.

3.2. FOXRED1 Protein Modeling

All the variants identified so far are located in different regions of the protein and are displayed in the FOXRED1 domain structure (Figure 2A). In Figure 2B, model structures for FOXRED1 with and without the mutation c.920G>A (p.Gly307Glu) are represented. As shown in the image, highlighted with a red arrow, it seems that the missense mutation which induces the change of the non-polar amino acid Glycine to the negatively charged Glutamic acid, displaces the spatial protein structure. In this specific region of the protein loop (red arrow), positively charged amino acids such as Arginine and Lysine are present, and non-polar methionine. The quaternary structure of FOXRED1 changes induced by p.G307E mutation can impact the protein function and, therefore, the susceptibility for disease.

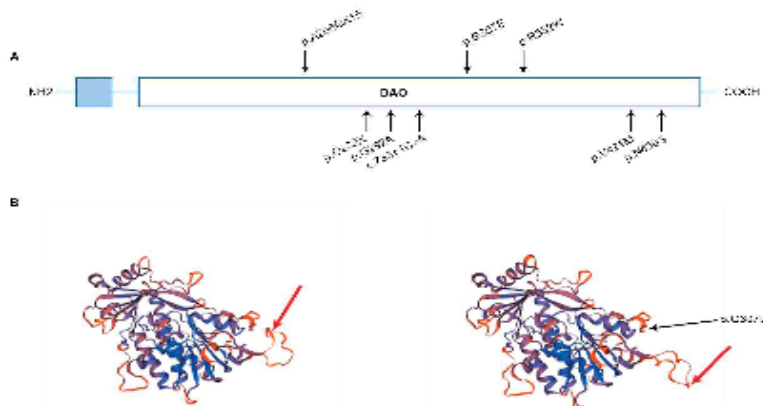


Figure 2. (A) Domain structure of FOXRED1 with all the variants identified in the described cases. In light blue, the cleavable mitochondrial targeting sequence is shown or displayed. DAO—FAD-dependent oxidoreductase. (B) FOXRED1 protein modeling wild-type and FOXRED1 protein modeling with the mutation p.G307E, reflecting the predicted consequences in the spatial protein structure due to the change of the non-polar amino acid Glycine to the negatively charged Glutamic acid.

3.3. Mitochondrial Respiration and OXPHOS Activity

Measurements of OCR and ECAR were performed as well. Significant reductions of both OCR and ECAR in our patient cell line were observed, indicating reduced electron flow through the respiratory chain (Figure 3A,B). These results reflect the deficiency of the cumulative proficiency of the whole set of mitochondrial respiratory chain complexes in patient fibroblasts. Spectrophotometric analysis of respiratory chain enzyme activities revealed an isolated deficiency of complex I (82% of the lowest value of the control range) in fibroblasts from the patient with normal activities of complexes II, III, IV, and V (Figure 3C).

3.4. SDS-PAGE and BN-PAGE Immunoblot Analysis

In Figure 3D, the presence of FOXRED1 protein is shown by SDS-PAGE. Immunoblot analysis of one-dimensional Blue-Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) gels showed a marked reduced steady-state level of complex I holoenzyme in patient fibroblasts mitochondria (Figure 3E). Different amounts of samples were used, 15 and 25 μ g, respectively, and in both cases, there is a clear deficiency of complex I in fibroblasts cells when comparing to control cell lines.

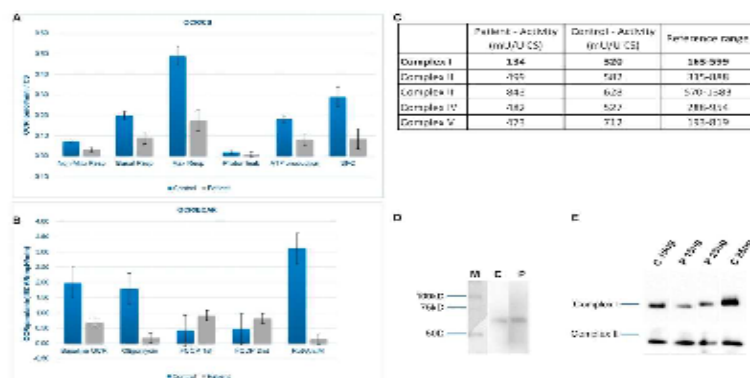


Figure 3. (A) Oxygen Consumption Rate (OCR) is measured before and after the addition of inhibitors. The Seahorse XF Cell Mito Stress Test uses compounds of respiration that target components of the Electron Transport Chain (ETC) in the mitochondria to reveal key parameters of metabolic function. These modulators are ETC inhibitors (oligomycin, FCCP, and a mix of rotenone and antimycin A) which were serially injected to measure ATP (adenosine triphosphate) production, maximal respiration (Max Resp), non-mitochondrial respiration (Non-Mito Resp), proton leak, spare respiratory capacity (SRC) and basal respiration (Basal Resp). (B) The basal energy metabolism of each cell line was assessed by analyzing OCR/ECAR ratios through sequential injections of the inhibitors. (C) Measurement of enzyme activities for the different oxidative phosphorylation system (OXPHOS) complexes in patient and control fibroblasts. FOXRED1 migrated at its predicted size of 54 kDa. CS—Citrate synthase. (D) SDS-PAGE immunodetections of FOXRED1 in control and patient fibroblasts. (M) Marker, (C) Control, and (P) Patient. Blot was cropped from different parts of the same gel to show results from samples of interest. A full-length gel is included in Supplementary Material. (E) One-dimensional Blue-Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analysis of complex I in gel activity and western blot immunodetection showing differences in complex I amount between control (C) and patient (P) fibroblasts. Blot was cropped from different parts of the same gel to show results from samples of interest. A full-length gel is included in Supplementary Material.

4. Discussion

In this work, we have presented the data supporting the pathogenicity of the compound heterozygous *FOXRED1* variants identified in our patient and his brother, in which the splicing mutation c.733+1G>A is reported for the first time. The molecular characterization using the patient's fibroblasts clearly demonstrated a mitochondrial dysfunction due to abnormal mitochondrial respiration with a significant decrease in the OCR/ECAR ratio, OXPHOS activity and reduced complex I. The genetic results of all the cases described so far, including those presented in this work, are consistent with a recessive mode of inheritance. All the *FOXRED1* pathogenic variants identified lead to a loss of complex I activity and mitochondrial disease.

Patients who show complex I deficiency due to defects in nuclear genes usually have a severe clinical presentation and are associated with early age of death [11]. Pathogenic variants in *FOXRED1*, a nuclear gene which encodes an assembly factor of complex I, seem to challenge this observation. Most of the patients harboring *FOXRED1* pathogenic variants survived to late childhood and adulthood (Supplementary Table S1). Formosa et al. suggested that variants in this gene can result in *FOXRED1* partial loss of function and the pathogenic variants are probably hypomorphic [14]. However, Apatian

et al. have recently described a clinical case of a female patient, with two variants in the *FOXRED1* gene (c.612_615dupACTG (p.Ala206fsX15) and c.874G>A (p.Gly292Arg)) who died at 3 months with severe pulmonary hypertension and lactic acidosis [21]. From the five patients reported in the literature, Calvo et al. and Apatéan et al. give a detailed description of the patients' clinical presentation, and, as is expected in complex I deficiency, both presented congenital lactic acidosis [19,21]. Our index case and his brother have shown not only a later onset of clinical symptoms but also a later onset of lactic acidosis and the latter has shown mild lactic acidosis as a result of exercise. They both show a less serious clinical presentation in comparison with the previously published cases. Their psychomotor development was not as severely affected as the reported patients. In addition, besides sharing the same *FOXRED1* pathogenic variants, both siblings show great clinical differences between them regarding their quality of life. The youngest, our index case, has lower muscular tone, latent strabismus of the right eye, fewer repetitive crises, low schooling, needs to nap for hours and takes 9 g of bicarbonate per day plus supplements. The older brother has a normal life, with no muscular or visual difficulties, with a normal school attendance although with certain behavioral alterations and learning disorders and he never had a crisis. This clinical variability on disease severity associated with *FOXRED1* mutations can be interpreted as a result of incomplete penetrance, a residual function of the *FOXRED1* protein and/or other factors controlling gene expression.

Furthermore, *FOXRED1* has been proposed to be a dual function protein: an assembly factor for complex I biogenesis and a key enzyme of amino acid metabolism [37]. As a member of the D-amino acid oxidases, *FOXRED1* is functional as an oxidoreductase, and it is hypothesized that this protein can participate in glycine metabolism, which in turn modulates glutathione biosynthesis, an antioxidant protecting the cells from Reactive Oxygen Species (ROS) [32,38]. As previously stated, complex I is the major entry point for electrons into the respiratory chain and also a major producer of ROS species. Mitochondrial disorders are often conditions of oxidative stress (e.g., Leigh syndrome, epilepsy) and symptoms can arise as a result of a functional deficiency that has an assembly factor, reducing complex I activity with a significant increase in ROS species, and, on the other hand, as a result of metabolic activity deficiency, leading to glutathione depletion and preventing the correct cellular ROS detoxification. It could be that depending on the mutation location in *FOXRED1*, the impact on the quaternary structure of the protein and, therefore, in its loss of function, can affect complex I assembly and/or metabolic activity of the ROS species in different forms, influencing the clinical severity spectrum of these disorders. Further studies are needed to elucidate how both functions could be interacting with the molecular mechanism of the disorders associated with *FOXRED1* dysfunction.

Overall, in this work we describe two cases of complex I deficiency due to *FOXRED1* pathogenic variants and discuss how *FOXRED1* variants may cause a broad clinical spectrum and be associated with different levels of disease severity—from the severe clinical presentation of patient 6, a three-month-old girl who died from disease complications to the mild presentation of patient 2, the brother of our index case. We demonstrated that the compound heterozygous variants identified were clearly associated with complex I deficiency. More research work is needed to achieve a deep understanding of the relationship between the molecular mechanism and disease progression. This will help in the development of future therapeutic treatments by focusing on specific therapeutic agents, since the responsiveness to a certain treatment may depend on specific gene mutations.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/8/1262/s1>, Table S1: Clinical features observed in the 6 patients described so far harboring pathogenic variants in *FOXRED1*, Table S2: *In silico* analysis to predict *FOXRED1* variants pathogenicity according to ACMG guidelines.

Author Contributions: S.B.-G., R.R., and M.L.C. designed the study, reviewed the publications included in the systematic review, contributed to the acquisition and analysis of the data, and wrote the manuscript. L.G.-S. contributed to the acquisition of the data and review of the manuscript. L.W. and A.K. participated in the performance, analysis, and interpretation of the data. E.G.-V., F.B., R.L., and L.v.d.H. participated in the analysis and critical review of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding: This study was supported with a competitive Ph.D. grant by Pre-Doctoral scholarship, for research groups of the Health Research Institute of Santiago (IDIS).

Acknowledgments: We are extremely grateful to the family for their collaborative support in this work. We also want to thank José Ramalho for his art design contribution and Frans van den Brandt and Daan Panneman for their help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Valsecchi, F.; Koopman, W.J.H.; Manjari, G.R.; Rodenburg, R.J.; Smeitink, J.A.M.; Willems, P.H.G.M. Complex I disorders: Causes, mechanisms, and development of treatment strategies at the cellular level. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **2010**, *16*, 175–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tucker, E.J.; Compton, A.G.; Calvo, S.E.; Thorburn, D.R. The molecular basis of human complex I deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* **2011**, *34*, 669–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cooper, G.M. The Mechanism of Oxidative Phosphorylation. In *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed.; National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA, 2000.
- Sharma, L.K.; Lu, J.; Bai, Y. Mitochondrial respiratory complex I: Structure, function and implication in human diseases. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1266–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brandt, U. Energy converting NADH: Quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 69–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gaerembois, S.; Baertling, F.; Kownatzki, D.; Wessels, H.J.; Arnold, S.; Brandt, U.; Nijtmans, L. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 128–139. [[CrossRef](#)]
- Rodenburg, R.J. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1857*, 938–945. [[CrossRef](#)]
- Ugalde, C.; Janssen, R.J.R.; van den Heuvel, L.P.; Smeitink, J.A.M.; Nijtmans, L.G.J. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 659–667. [[CrossRef](#)]
- Mimaki, M.; Wang, X.; McKenzie, M.; Thorburn, D.R.; Ryan, M.T. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1817*, 851–862. [[CrossRef](#)]
- Schultz, B.E.; Chan, S.I. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 23–65. [[CrossRef](#)]
- Nouws, J.; Nijtmans, L.G.J.; Smeitink, J.A.; Vogel, R.O. Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: Cause, pathology and treatment options. *Brain* **2012**, *135*, 12–22. [[CrossRef](#)]
- Simon, M.T.; Eftekharian, S.S.; Stover, A.E.; Osborne, A.E.; Braffman, B.H.; Chang, R.C.; Wang, R.Y.; Steenari, M.R.; Yang, S.; Wu, P.W.L.; et al. Novel mutations in the mitochondrial complex I assembly gene NDUFAB5 reveal heterogeneous phenotypes. *Mol. Genet. Metab.* **2019**, *126*, 53–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pagliarini, D.J.; Calvo, S.E.; Chang, B.; Sheth, S.A.; Vafai, S.B.; Ong, S.E.; Walford, G.A.; Sugiana, C.; Boneh, A.; Chen, W.K.; et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **2008**, *134*, 112–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Formosa, L.E.; Mimaki, M.; Frazier, A.E.; McKenzie, M.; Stait, T.L.; Thorburn, D.R.; Stroud, D.A.; Ryan, M.T. Characterization of mitochondrial FOXRED1 in the assembly of respiratory chain complex I. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 2952–2965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Distelmaier, F.; Koopman, W.J.H.; van den Heuvel, L.P.; Rodenburg, R.J.; Mayatepek, E.; Willems, P.H.G.M.; Smeitink, J.A.M. Mitochondrial complex I deficiency: From organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* **2009**, *132*, 833–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kirby, D.M.; Crawford, M.; Cleary, M.A.; Dahl, H.H.; Dennett, X.; Thorburn, D.R. Respiratory chain complex I deficiency: An underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* **1999**, *52*, 1255–1264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alston, C.L.; Rocha, M.C.; Lax, N.Z.; Turnbull, D.M.; Taylor, R.W. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J. Inher. Metab. Dis.* **2017**, *40*, 236–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Calvo, S.E.; Tucker, E.J.; Compton, A.G.; Kirby, D.M.; Crawford, G.; Burt, N.P.; Rivas, M.; Guiducci, C.; Bruno, D.L.; Goldberger, O.A.; et al. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NDUPL1 and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 851–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Fassone, E.; Duncan, A.J.; Taanman, J.W.; Pagnamenta, A.T.; Sadowski, M.L.; Holand, T.; Qasim, W.; Rutland, P.; Calvo, S.E.; Mootha, V.K.; et al. FOXRED1, encoding an FAD-dependent oxidoreductase complex-I-specific molecular chaperone, is mutated in infantile-onset mitochondrial encephalopathy. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 4837–4847. [[CrossRef](#)]
20. Zurita Rendón, O.; Antonicka, H.; Horvath, R.; Shoubridge, E.A. A Mutation in the Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Oxidoreductase FOXRED1 Results in Cell-Type-Specific Assembly Defects in Oxidative Phosphorylation Complexes I and II. *Mol. Cell Biol.* **2016**, *36*, 2132–2140. [[CrossRef](#)]
21. Apatean, D.; Rakic, B.; Brunel-Guitton, C.; Henderson, G.; Bai, R.; Sargent, M.A.; Lavoie, P.M.; Patel, M.; Stockler-Ipsiroghu, S. Congenital lactic acidosis, cerebral cysts and pulmonary hypertension in an infant with FOXRED1 related complex I deficiency. *Mol. Genet. Metab. Rep.* **2019**, *18*, 32–38. [[CrossRef](#)]
22. Haack, T.B.; Madignier, F.; Herzer, M.; Lamantea, E.; Danhausen, K.; Invernizzi, F.; Koch, J.; Freitag, M.; Drost, R.; Hillier, I.; et al. Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9. *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 83–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Agilent SureDesign. Available online: <https://earray.chem.agilent.com/sure-design/> (accessed on 15 March 2019).
24. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. NGSrich. Available online: <https://sourceforge.net/projects/ngsrich/> (accessed on 11 October 2018).
26. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Picard Tools by Broad Institute. Available online: <http://broadinstitute.github.io/picard/> (accessed on 15 March 2019).
28. Koboldt, D.C.; Chen, K.; Wylie, T.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Mardis, E.R.; Weinstock, G.M.; Wilson, R.K.; Ding, L. VarScan: Variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2283–2285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup the Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
30. Wang, K.; Li, M.; Hakonarson, H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; et al. On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–423.
32. Lemire, B.D. Evolution of FOXRED1, an FAD-dependent oxidoreductase necessary for NADH: Ubiquinone oxidoreductase (Complex I) assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1847*, 451–457. [[CrossRef](#)]
33. Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; Madden, T.L. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinform.* **2009**, *10*, 421. [[CrossRef](#)]
34. Remmert, M.; Biegert, A.; Hauser, A.; Söding, J. HMMER: Lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* **2011**, *9*, 173–175. [[CrossRef](#)]
35. Srere, P.A. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1969; Volume 13, pp. 3–11.
36. Rodenburg, R.J.T. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J. Inher. Metab. Dis.* **2011**, *34*, 283–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lemire, B.D. A structural model for FOXRED1, an FAD-dependent oxidoreductase necessary for NADH: Ubiquinone oxidoreductase (complex I) assembly. *Mitochondrion* **2015**, *22*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lemire, B.D. Glutathione metabolism links FOXRED1 to NADH: Ubiquinone oxidoreductase (complex I) deficiency: A hypothesis. *Mitochondrion* **2015**, *24*, 105–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



REVIEW ARTICLE

NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research, Diagnosis, and Treatment

Ana Fernández-Marmiesse*, Sofia Gouveia, and María L. Couce*

Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Abstract: Approximately 25-50 million Americans, 30 million Europeans, and 8% of the Australian population have a rare disease. Rare diseases are thus a common problem for clinicians and account for enormous healthcare costs worldwide due to the difficulty of establishing a specific diagnosis. In this article, we review the milestones achieved in our understanding of rare diseases since the emergence of next-generation sequencing (NGS) technologies and analyze how these advances have influenced research and diagnosis. The first half of this review describes how NGS has changed diagnostic workflows and provided an unprecedented, simple way of discovering novel disease-associated genes. We focus particularly on metabolic and neurodevelopmental disorders. NGS has enabled cheap and rapid genetic diagnosis, highlighted the relevance of mosaic and *de novo* mutations, brought to light the wide phenotypic spectrum of most genes, detected digenic inheritance or the presence of more than one rare disease in the same patient, and paved the way for promising new therapies. In the second part of the review, we look at the limitations and challenges of NGS, including determination of variant causality, the loss of variants in coding and non-coding regions, and the detection of somatic mosaicism variants and epigenetic mutations, and discuss how these can be overcome in the near future.

ARTICLE HISTORY

Received: April 29, 2017
 Revised: June 19, 2017
 Accepted: July 14, 2017

DOI:
 10.2174/0920867324666170714101946

Keywords: Next generation sequencing, rare diseases, diagnosis, research, digenic inheritance, genome, exome.

1. INTRODUCTION: ADVANCES IN THE FIELD OF RARE DISEASES REACHED THANKS TO THE NGS TECHNOLOGY

There is no doubt that the emergence of NGS technologies constituted a turning point for the advancement of our understanding of rare diseases. Excellent reviews on the influence of NGS on rare diseases have been published [1-3]. In this first section, we will describe the main milestones that have been achieved thanks to the use of this technology.

1.1. Changes in Diagnostic Workflow

Until just several years ago, genetic analysis was considered the final stage of the diagnostic process in

patients with a rare disease. After a process typically lasting years, involving the documenting of clinical manifestations and performance of imaging and biochemical tests, patients suspected to have a genetic disorder were referred for genetic analysis by Sanger sequencing, which is a highly manual and time-consuming chemical process. The success rates, however, were low. The emergence of NGS about 10 years ago radically changed this diagnostic workflow by providing a quick, powerful, and low-cost alternative for genetic analysis in the early stages of the process. In just a few weeks or even less, NGS-based tools can point to the implication of a single gene (or a small number of genes) and help to establish a rapid diagnosis in a considerable percentage of cases. This new workflow has drastically reduced waiting times and shortened the often endless quest that many patients had to embark on to find a prognosis. It therefore comes as no surprise that the best healthcare systems in

*Address correspondence to this author at the Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Rua Choupana s/n CP 15706 Santiago de Compostela, Spain; Tel/Fax: ++0034-981-950-102, +0034-981-950-101; E-mail: amarmiesse@gmail.com

the world now use these powerful tools as part of their routine diagnostic processes.

NGS has also led to a new process known as *reverse phenotyping*. On occasions the combined use of NGS and segregation analysis can identify a pathogenic mutation in a gene that is known to cause disease but that was previously linked to a different phenotype. In such cases, retrospective clinical investigation of the patient and family members can reveal additional, previously unrecognized features. In a review of over 300 studies that had investigated rare disease by WES, Boycott *et al.* [1] indicated that approximately 25% of reported mutations in known disease-causing genes were associated with a phenotype that, in retrospect, matched the clinical presentation of the patient being investigated. Many examples of reverse phenotyping can be found in recent literature [4-10]. Their findings show that the order and intensity in which symptoms appear in rare diseases vary greatly from patient to patient, explaining why it is so difficult to establish a diagnosis. Only a few years ago, physicians had no choice but to watch and wait as the different symptoms began to emerge over the course of years. The process could perhaps be likened to watching the grass grow. NGS, however, has provided clinicians with powerful molecular tools that they can use at the start of the diagnostic progress to unveil important clues that enable them to start investigating manifestations that are not yet fully expressed or may not even have yet appeared.

1.2. Easy and Rapid Isolation of Novel Disease-Causing Genes

The number of newly identified disease-associated genes has grown exponentially in all fields of medicine since the emergence of NGS technology. Figure (1) shows the increases in the number of entries for which the molecular basis of a particular phenotype is known in the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database over the past 10 years. This explosion of knowledge has taken place because NGS can be used to sequence any region of the human genome, ranging from several genes to the whole genome, in a fast and sensitive manner. Three main NGS-based tests are used in rare disease research. These tests can be ordered by cost, ease of analysis, and scope and include 1) parallel sequencing of coding sequences (exons) of groups of genes related by similar or overlapping phenotypes (gene panels); 2) whole-exome sequencing (WES), in which all known coding regions of the human genome are sequenced; and 3) whole-genome sequencing (WGS), which analyzes the entire human genome. WES has dominated rare disease research in recent years. It covers just the 1% (~30Mb) of the human genome that is translated into protein [11] but compared with WGS, it offers a significantly more cost- and time-effective method of collecting and analyzing genomic data. Gene panels, in turn, offer much faster turnaround times, fewer incidental findings, and higher coverage (thereby increasing the chances of detecting CNVs and somatic mosaic mutations) than WES. Un-

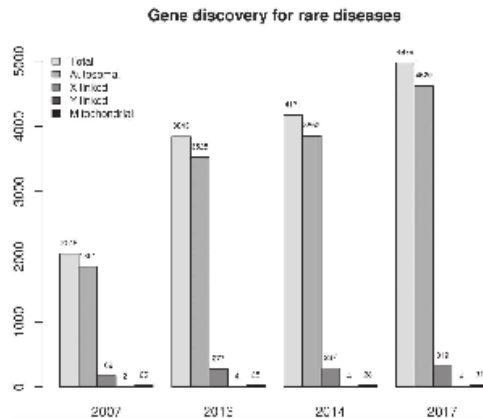


Fig. (1). Gene discovery for rare diseases.

fortunately, however, they are not capable of identifying novel disease-causing genes.

1.2.1. Strategies to Identify Disease-Causing Genes

The identification of new genes associated with human disease or known genes associated with new phenotypes contributes to our understanding of the biological bases of disease and is of great importance for patient management, and in some cases even for therapeutic intervention [12]. Two main approaches have been used to isolate disease-causing genes: 1) analysis of the exome (WES) or genome (WGS) of a group of patients with the same clinical characteristics and filtering of variants to be placed in a common gene for all or some of the members of the group; and 2) analysis of isolated patients in conjunction with parents and/or informative members of their family and filtering of variants by different modes of inheritance (autosomal dominant, recessive, X-linked or *de novo* hypothesis) to reduce the number of variants to a sufficiently small number to allow identification of the causal gene.

1.2.2. Successful Application of WES in the Last 10 Years

The year 2010 witnessed the first two successful applications of WES. In the first case, a group from the University of Washington Center for Mendelian Genomics uncovered the genetic cause of Miller syndrome, characterized by severe micrognathia, cleft lip and/or palate, hypoplasia or aplasia of the postaxial elements of the limbs, coloboma of the eyelids, and supernumerary nipples [13]. They performed WES on four unrelated individuals with this syndrome in three independent kindreds. After filtering against public SNP databases and eight HapMap exomes, and looking for genes with two previously unknown variants in each of the four individuals, they were able to identify a single candidate gene, *DHODH*, which encodes a key enzyme in the pyrimidine *de novo* biosynthesis pathway. Sanger sequencing confirmed the presence of *DHODH* mutations in three additional families with Miller syndrome. In the same year, the same approach successfully identified the causative genes for Kabuki (*MLL2*) [14], Schinzel-Giedion (*SETBP1*) [15], and Sensenbrenner (*WDR35*) [16] syndromes.

Soon afterwards, publications of diagnostic applications of WES using a different strategy began to appear. One landmark study carried out by Goldstein and collaborators in 2012 tested trio-WES (sequencing of a patient and his/her biological parents) in 12 patients with different unexplained genetic conditions. They

succeeded in confirming a genetic diagnosis in six of the patients, and were even able to propose a potential treatment based on the diagnosis in some of them [17]. In the same year, the NIH Undiagnosed Diseases Program (Bethesda) published its first large study describing the results of the first two years of a program for the application of genomic technology to establish rare disease diagnoses. They studied 160 patients (47% children and 53% with neurological disorders) and established a diagnosis in 39 of these (24%). Three disorders were diagnosed based on single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis and an additional three were diagnosed using WES and variant filtering. Two new disorders were also discovered: arterial calcification due to deficiency of *CD73* and a familial distal myopathy caused by a mutation in *HINT3* [18]. In 2013, an almost identical diagnostic rate of 25% was reported by the Medical Genetics Laboratory from Baylor College (Houston, USA) in a study in which WES was applied to the clinical diagnosis of a cohort of 250 patients [19]. The diagnostic rate remained unchanged when the study population was later increased to 2000 patients [20]. Another study of 814 patients at the University of California reported a diagnostic rate of 26% [21]. In all the studies, diagnostic rates were higher when the trio-WES rather than a patient-only strategy was applied. The respective rates reported by Farwell and coworkers [20] were 37% versus 21%. Similar findings were reported by studies performed in Canada (FORGE: Finding of Rare Diseases Genes) [22] and by the Department of Pediatrics at Columbia University Medical Center [23]. The diagnostic yield of WES seems to be much higher than that of Sanger sequencing (which involves the sequential screening of many candidate genes), especially in the cases of highly heterogeneous disorders such as deafness, blindness, mitochondrial disease, and movement disorders [19]. According to one study from the exome sequencing center at St Radboud University Medical Center in Nijmegen, the Netherlands, the diagnostic yield of WES was at least 50% greater than that of Sanger sequencing [24]. In the next section, we will review, but by no means exhaustively, the most recent and/or relevant novel genes that have been identified in rare metabolic, neurodevelopmental, and neuromuscular diseases thanks to NGS.

1.2.2.1. Metabolic Disorders

Metabolic disorders are conditions that disrupt normal metabolism in human cells. Thousands of enzymes participating in numerous interdependent metabolic pathways are necessary for this process. Metabolic dis-

orders, however, are not restricted to diseases that show increased or decreased levels of biochemical parameters in blood, urine, or CSF samples. Many disorders do not have any biochemical markers and are associated with a wide variety of neurological phenotypes (movement, neuromuscular and myelin disorders), as we will see in the following sections.

Hyperphenylalaninemia is the paradigmatic example of a metabolic condition. It is an autosomal recessive inborn error of metabolism resulting from a deficiency of phenylalanine hydroxylase or one of four enzymes involved in the synthesis or regeneration of BH4, a cofactor for this enzyme. The first *HPA* mutation was identified 30 years ago [25]. Surprisingly, this year, a novel gene underlying this phenotype (*DNAJC12*) was found through WES [26]. This gene encodes a heat shock co-chaperone family member that interacts with phenylalanine, tyrosine, and tryptophan hydroxylases catalyzing the BH4-activated conversion of phenylalanine into tyrosine, tyrosine into L-dopa, and tryptophan into 5-hydroxytryptophan. This metabolic deficiency leads to dystonia and intellectual disability in addition to hyperphenylalaninemia.

Last year, two novel genes were added to the list of genes involved in complex molecule metabolism disorders, which are associated with all the enzymes involved in lysosomal, peroxisomal, and cholesterol metabolism. These were *ACER3*, which hydrolyzes the amide linkage of ceramides, leading to a leukodystrophy phenotype [27] and *NPL*, which codes for N-acetylneuraminidase pyruvate lyase, which controls the cellular concentration of sialic acid by catalyzing the conversion of sialic acid into acylmannosamines and pyruvate. *NPL* mutations were found to be associated with dilated cardiomyopathy, sensorineural hearing loss, and unexplained sialic aciduria [28].

Mitochondrial disease deserves special mention within the category of metabolic disorders. Many genes associated with mitochondrial disease have been identified by WES since the explosion of NGS. The first findings in this field took place between 2010 and 2012 with the research of Haack, Calvo, and Taylor [29-32]. Their initial findings triggered the search for — and identification of — combined oxidative phosphorylation deficiency genes, with 16 new OMIM entries since 2013, and other genes associated with mitochondrial function or implicated in disorders resembling mitochondrial disease [28, 33-42]. One particularly relevant conclusion to be drawn from these studies is that many of the so-called mitochondrial diseases diagnosed on

the basis of clinical or biochemical criteria are actually rare syndromes or other neurological or metabolic diseases with unusual presentations but a high level of phenotypic overlapping with mitochondrial disease [43-44]. There have even been reports of cases in which a supposed mitochondrial disease phenotype was in fact the result of two overlapping rare disease phenotypes. This overlapping probably explains why the diagnostic rate for mitochondrial disease using gene panels is so low (15-20%).

Using a combination of a panel targeting 135 genes associated with this group of disorders and WES, Legati *et al.* [45] revealed unexpected and conceptually new findings, including the possibility of marked variable penetrance of recessive mutations, the identification of large-scale DNA rearrangements explaining spuriously heterozygous cases, and the association of mutations in known genes encoding non-mitochondrial protein with unusual previously unreported clinical phenotypes.

1.2.2.2. Neurodevelopmental Disorders

Our molecular understanding of epileptic disorders has increased enormously in recent years. Many novel epilepsy-associated genes have been found through WES [46-58] since the publication of a large study from the EpiK consortium in 2013 that revealed several new loci potentially associated with early-onset epileptic encephalopathy [59]. Although *de novo* dominant mutations are frequently identified in association with epileptic disorders, somatic mosaicism and recessive disorders are also seen. Several genes can cause a single electro clinical syndrome, and, conversely, a single gene may be associated with phenotypic pleiotropy. Ion channels and proteins needed for synaptic, regulatory, and developmental functions have been found to underlie these disorders. Gene discovery provides the basis for neurobiological insights, and convergence of mechanistic pathways is frequently seen. These findings underpin the development of targeted therapies, which are essential for improving the outcome of these devastating disorders [60].

WES has also had an important role in the diagnosis of intellectual disability. WES studies performed with cohorts of patients with intellectual disability have provided strong experimental support for a *de novo* mutation paradigm for this condition. Together with *de novo* copy number variations (CNVs), *de novo* point mutations of large effect could explain the majority of all cases of intellectual disability in the population [61-63].

Very similar molecular findings have emerged from WES studies of autism spectrum disorder (ASD), a group of neurodevelopmental diseases that show strong heritability. As with epilepsy and intellectual disability disorders, the molecular architecture of ASD seems to be characterized by rare *de novo* events in many different genes [64-70]. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of *de novo* mutations [71]. A review by Reiner *et al.* (2016) connected ASD and aberrant neuronal migration during brain development and discusses recent advancements in the field connecting ASD with brain morphogenesis disorders [72-73].

Development disturbances that originate during fetal life are generally caused by changes in neuronal cell migration and/or proliferation that lead to brain morphogenesis disorders. The molecular story told by WES studies in this area has much to do with *de novo* and/or mosaic mutations in ectodermal tissues. The genes involved in brain morphogenesis disorders have also grown in recent years and many of the mutations implicated have been found in somatic mosaicism, as we will discuss later [74-81].

Psychiatric disorders had never been considered monogenic diseases until recently, but the use of NGS in psychiatric patients has yielded findings that support a *de novo* mutational paradigm, including CNVs and single nucleotide variants (SNVs), for disorders of this kind [82-86].

1.2.2.3. Neuromuscular Disorders

Neuromuscular disorders are conditions that result from disorders or lesions of the peripheral nervous system. They include disorders of the motor unit or the sensory component and more specifically of motor neurons, dorsal roots ganglia, spinal roots, cranial nerves, peripheral nerves, neuromuscular junctions, and muscles. In this section we will look at some of the advancements in this field since the emergence of NGS.

Several novel genes have been found to underlie novel limb-girdle muscular dystrophies (LGMDs). These include *LIIS2*, which encodes a protein critical for muscle attachment (LGMD2W) [87], the *BYES* gene (LGMD2X), which encodes a membrane protein abundantly expressed in heart and muscle that may play an important role in development of these tissues [88], *TOR1AIP1*, involved in the regulation of torsin A ATPase (TOR1A) (LGMD2Y) [89], and the endoplasmic reticulum (ER) O-glucosyltransferase gene *POGLUT1* (LGMD2Z) [90].

Novel forms of myofibrillar myopathies have been found, such as myofibrillar myopathy 7, associated with the *KY* gene, which interacts with several sarcomeric cytoskeletal proteins including filamin C (*FLNC*) and the slow isoform of the myosin-binding protein C (*MYBPC1*) [91], and myofibrillar myopathy 8, associated with the *PYROXD1* gene, which belongs to a family of pyridine nucleotide-disulfide reductases [92]. Two new centronuclear myopathies have also been characterized molecularly: centronuclear myopathy 4, associated with the *CCDC78* gene [93], which encodes a protein important for skeletal muscle function; and centronuclear myopathy 5, associated with the *SPEG* gene [94], which encodes a protein that resembles members of the myosin light chain kinase family required for myocyte cytoskeletal development. *ALG2*, which codes for an alpha-1,3-mannosyltransferase that catalyzes the second and third mannosylation steps in the N-linked glycosylation pathway, and *ALG14*, which codes for a UDP-GlcNAc transferase, responsible for catalyzing a key step in endoplasmic reticulum N-linked glycosylation, have been linked to congenital myasthenic syndrome 14 and 15 [95]. Just last year, another novel congenital myasthenic syndrome was associated with mutations in the *MYO94* gene [96], which encodes an unconventional myosin (containing the basic domains of conventional myosin but possessing distinctive tail domains) which functions as actin-based molecular motors.

Finally, biallelic mutations in the voltage-gated sodium channel *SCN10A* were recently implicated in both neuromuscular disease and epileptic cephalopathy [97].

Last year, mutations in two genes involved respectively in the metabolism of heparan sulfate and triglycerides were linked to dominant Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. A heterozygous mutation in the *NA-GLU* gene, which in a recessive manner has long been associated with the well-known lysosomal storage disorder mucopolysaccharidosis type IIIB, was found to cause CMT type 2V in a dominant manner. The mutation, found by WES, segregated with the disorder in the family and patient leukocytes showed significantly decreased NAGLU enzyme activity (36-54% of controls), which is consistent with a detrimental effect of the mutation [98]. Mutations in *DGAT2*, a gene that codes for an enzyme responsible for the synthesis of triglycerides, was associated with another dominant form of early-onset axonal CMT [99]. Mutations in the *MORC2* gene, a DNA-dependent ATPase that relaxes chromatin to facilitate DNA double-strand break repair, have also

been linked to the dominant CMT [100]. Mutations in two aminoacyl-tRNA synthetase genes, *HARS* and *MARS*, have also been found to be responsible for dominant forms of CMT types 2U and 2W [101-102].

Finally, three novel hereditary sensory neuropathy disorders (1D, 1E, 1F) have been characterized through WES in the loci *ATL1* (whose protein product is potentially involved in axonal maintenance, as suggested by the spastic paraplegia type 3 caused by defects in this gene), *DNMT1* (the main enzyme responsible for maintaining methylation patterns following DNA replication), and *ATL3* (whose protein product is required for proper formation of the network of interconnected tubules of the endoplasmic reticulum), respectively [103-105].

1.2.2.4. Movement Disorders

NGS has also led to significant breakthroughs in three groups of neurodegenerative disorders: 1) spinocerebellar ataxia (SCA), characterized by coordination problems caused mainly by atrophy of the cerebellum; 2) dystonia, linked to basal ganglia dysfunction, although evidence is now pointing to involvement of the cerebellum and two major pathways (the synaptic transmission and neurodevelopment pathways); and 3) hereditary spastic paraplegia (HSP), whose main feature is progressive gait impairment. In this next part, we will summarize nine scientific findings related to novel genes associated with movement disorders identified by WES this year. The first case involves a family with a complicated form of HSP caused by a homozygous mutation in *SELENO1* [106], responsible for the final step in the Kennedy pathway forming phosphatidylethanolamine which, together with phosphatidylcholine, constitutes more than half of the total phospholipids in eukaryotic cell membranes. The association was supported by functional analyses. The second finding was the involvement of the *DOCK3* gene, which plays an important role in axonal outgrowth and cytoskeleton reorganization, in a disorder with hypotonia, ataxia, and intellectual disability. WES-trio analyses identified a maternally inherited nonsense variant and a paternally inherited 458-kb deletion in chromosomal region 3p21.2 disrupting the *DOCK3* gene [107]. A *de novo* point mutation in the *GRIK2* gene, a member of the ionotropic glutamate receptor gene family, was found to be the cause of disease in a 10-year-old patient with ataxia, motor and speech delay, and intellectual disability. Functional characterization of the mutated protein supported the association [108]. A homozygous mutation in *SLC30A9*, which is involved in intracellular zinc homeostasis, was found in a consan-

guineous Bedouin family with neurological deterioration progressing into severe intellectual disability, profound ataxia, camptocormia, and oculomotor apraxia [109]. For the first time ever, a report linked *PNPLA6* mutations with pure SCA without chorioretinal dystrophy or hypogonadotropic hypogonadism, constituting another example of phenotypic expansion [110]. The next finding is an example of how dominant and recessive mutations in the same gene can lead to completely different phenotypes. Dominant mutations in *DSTYK* (dual serine-threonine and tyrosine protein kinase) had already been implicated in congenital urological developmental disorders. Nevertheless, a recent study showed that a homozygous large intragenic deletion in this gene was responsible for complicated HSP in a Palestinian-Jordanian pedigree. The authors supported the finding by isolating the same mutation in previously reported pedigrees with the same phenotype [111]. Another interesting association recently detected is that between an autosomal recessive SCA and a mutation in the non-coding RNA *RNU12* that was detected by combining WGS and RNAseq analysis in a large consanguineous family. Homozygosity mapping, rare variant search, and comparison of the transcriptomes of affected and unaffected family members led to the detection of a homozygous point mutation in non-coding RNA *RNU12* [112].

Other important genes underlying movement disorders had been identified in previous years. Genes linked to different forms of SCA include genes involved in posttranslational modification, such as transglutaminase 6 (*TGM6*), metabotropic glutamate receptors (*GRM1* and *GRM6*), transporters (*ABC7*, *ATPIA3*), ion channels (*KCND3*), members of the synaptotagmin family of genes that encode membrane-trafficking proteins (*SYT14*) and proteins associated with mitochondrial metabolism (*AFG3L2*) [113-121]. Dystonia, in turn, was associated with hippocalcin (*HPCA*), a member of a family of neuron-specific Ca²⁺-binding proteins found in the retina and brain [122], the stimulatory G-alpha subunit of the G protein receptor (*GNAL*) [123], a brain-specific member of the beta-tubulin family (*TUBB4A*) [124], and *COL6A3*, previously associated with Ullrich and Bethlem myopathy [125]. Finally, *VPS35*, a component of the retromer cargo-recognition complex critical for endosome-trans-Golgi trafficking and the recycling of membrane-associated proteins, has been associated with Parkinson disease [126-127].

Important conclusions can be drawn from the above NGS studies. These conclusions are well presented in

two recent reviews [128, 129]. The first explores the similarities between SCA and dystonia, and suggests the existence of potentially shared molecular pathways that use a gene co-expression network approach. The second states that, although autosomal dominant and recessive SCA and HSP have traditionally been included in separate clinicogenetic disease classifications, the advent of NGS has shown an overlapping phenotype generating a continuous phenotypic spectrum. Various genes traditionally rooted in either the SCA or HSP classification system (e.g., *SPG7*, *SYNE1*, *PNPLA6*) have now been shown to cause SCA at one end of the disease continuum and HSP at the other. Other genes, such as *GBA2* and *KIF1C*, were almost simultaneously implicated in both HSP and SCA. The variability and fluidity of phenotypes along the ataxia-spasticity spectrum warrants a rethinking of traditional classification systems. The concept of a continuous ataxia-spasticity disease spectrum is further supported by the existence of common cellular pathways and disease mechanisms, suggesting shared vulnerability of cerebellar and corticospinal neurons for common pathophysiological processes. This could in fact be the mechanistic overlap that drives their clinical overlap.

1.2.2.5. Demyelinating Disorders

A demyelinating disease is any disease of the nervous system in which the myelin sheath of neurons is damaged. The damage impairs the conduction of signals in the affected nerves, which in turn causes deficiency in sensation, movement, cognition, and other functions depending on which nerves are involved.

Many genes have been added to the list of myelin disorder genes since 2011, when *POLR3A* and *POLR3B*, which encode the two largest subunits of RNA polymerase III, were identified as the molecular cause of hypomyelinating leukodystrophy 7 and 8 [130]. One of these, the *TUBB4A* gene, which encodes a brain-specific member of the beta-tubulin family, was identified as the cause of hypomyelinating leukodystrophy 6 [131]. The two most recent findings involve *CNTNAP1* and *PYCR2*. *CNTNAP1*, which is required for high-velocity nerve conduction, had been previously associated with a recessive lethal congenital contracture syndrome 7, but recent investigations showed that recessive mutations also cause a severe CNS disorder with hypomyelinating leukodystrophy and peripheral neuropathy of sensory-motor type [132]. This is yet another illustrative example of phenotype expansion. *PYCR2*, in turn, which is a mitochondrial enzyme that catalyzes the final step of proline biosynthesis and reduces pyrroline-5-carboxylate (P5C) to L-proline,

was found to be involved in the development of hypomyelinating leukodystrophy 10 [133].

1.3. Development of Gene Panels: Rapid, Low-cost NGS-based Tools for the Genetic Diagnosis of Rare Diseases

As genome and exome sequencing are usually overpowered for a diagnostic setting, analyses often focus (at least as an initial step prior to exome sequencing) on known disease-related genes. Only the coding regions of these particular genes are enriched by respective probes and subsequently sequenced within what are known as *gene panels*. While these genomic tools are not capable of isolating genes associated with novel diseases, they have important advantages with respect to WES in the field of clinical diagnosis. By reducing the number of regions to be examined, much deeper coverage can be achieved for each nucleotide interrogated. This reduces false positives and negatives and allows the detection of mosaic variants and much more powerful CNV detection. In addition, gene panel analyses do not reveal findings unrelated to the phenotype being investigated, avoiding incidental findings and ethical problems. Most important of all is the significant reduction in turnaround times, which have fueled the spread of these tools throughout rare disease reference centers.

Several studies in which gene panels have been used for clinical diagnosis have reported varying rates of diagnosis. Just some of the diseases studied to date are epilepsy [134, 135], metabolic disorders [31, 45, 136, 137], orofacial diseases [138], neuromuscular disorders [139-142], hereditary immunodeficiencies [143-144], hereditary motor neuropathies [145-147], amyotrophic lateral sclerosis [148], intellectual disability [149], hematologic diseases [150, 151], skeletal dysplasias [152], cardiovascular disorders [153-155], hearing loss [156-157], retinal disorders [158-163], sex development [164-165], maturity onset diabetes of the young [166], ichthyosis [167], cystic kidney diseases [168], and aortopathies [169].

1.4. Uncovering the Wide Phenotypic Spectrum of Genes

As many of the cases mentioned above illustrate, one of the major revelations of NGS is that most genes have a broad phenotypic spectrum, correcting the classic assumption on which previous diagnoses had been based: that there was a "one-to-one" relationship between gene and phenotype. This assumption had guided (or perhaps misguided) diagnostic processes for

many years and has also filled medical textbooks. It has long been known that certain genes can cause not only different but completely opposing phenotypes depending on the mutation carried. Examples are *ABCC8*, *KCNJ11*, and *GCK*, which, according to the variant expressed, can lead to hyperglycemia (neonatal diabetes) or hypoglycemia (congenital hyperinsulinism), two life-threatening conditions. We now know, however, that this characteristic, which was previously believed to be restricted to specific genes, is a widespread phenomenon. A simple search of the OMIM database will show that many genes are associated with different disorders, and that some of them even have different modes of inheritance. Labeling a gene thus as *recessive* or *dominant* would also now appear to be inaccurate. Under this new knowledge, we can expect that known disease-causing genes will be increasingly linked to new phenotypes with distinct pathological mechanisms. We will illustrate this point with two examples. Missense mutations in the *NOTCH2* gene had been shown to cause a variant form of Alagille syndrome (paucity of intrahepatic bile ducts, cholestasis, cardiac disease, skeletal abnormalities, ocular abnormalities, and a characteristic facial phenotype) [170], but in 2011 it was discovered that carboxy-terminal truncating mutations in the same gene cause Hajdu–Cheney syndrome, an autosomal dominant skeletal disorder characterized by short stature, coarse, dysmorphic facies, bowing of the long bones, and vertebral anomalies [171–173]. The second example is the *KCNQ2* gene, in which missense activating mutations cause severe neonatal onset epileptic encephalopathy while loss of function truncating mutations cause the much milder phenotype of benign neonatal seizures.

It has been anticipated that a considerable percentage of novel phenotypes will be reassigned as atypical presentations of known disorders and that the list of genes in which distinct mutations cause separate rare diseases will continue to grow [1]. Caution, however, must be exerted, since the possible overlapping of two or more genetic disorders, a finding that has also been uncovered by NGS, could also be playing a role in the apparent phenotype expansion of genes, as we discuss in another section.

1.5. The Prominent Role of *De Novo* Mutations in Rare Diseases

The importance of *de novo* chromosomal abnormalities underlying neurodevelopmental disorders has been recognized by the cytogenetics community for many decades, and parental analysis is an important

part of substantiating or excluding causality of rare chromosomal variants. The availability of high-resolution genomic microarrays in the past decade allowed the unbiased genome-wide analysis of *de novo* CNVs long before the same could be achieved for *de novo* SNVs and indels. Such analyses of CNVs have revealed the importance of genomic variations of this type in neurodevelopmental disorders such as intellectual disability, ASD, and schizophrenia [174, 175]. *De novo* CNVs larger than 100 kb are infrequent in the general population, occurring in approximately one in 50 individuals. A frequency, however, of approximately 10% is estimated for patients with sporadic intellectual disability [175, 176], ASD [177, 178], or schizophrenia [179]. The use of high-resolution genomic microarrays to analyze the genetics of these disorders has resulted in the identification of many new recurrent microdeletion syndromes, such as those caused by deletions affecting the chromosomal loci 1q21.1, 3q29, 15q13.3, 15q24, 17q12, and 17q21.31 [180].

As previously discussed, NGS applications have also brought to the fore the prominent role of *de novo* point mutations in the development of rare diseases, and in particular neurodevelopmental disorders such as epilepsy, brain morphogenesis defects, intellectual disability, ASD, and schizophrenia. *De novo* mutations represent the most extreme form of rare genetic variation: they are more deleterious, on average, than inherited variations because they have been subjected to less stringent evolutionary selection. *De novo* mutations provide a mechanism by which early-onset reproductively lethal diseases remain frequent in the population. They are thus prime candidates for causing severe genetic diseases that occur sporadically. Furthermore, they can occur in the germline, during embryo genesis, or somatically. Because *de novo* mutations are not rare events collectively, they might be responsible for an important fraction of more commonly occurring diseases through disruption of any one of a large number of genes. An excellent review of the role of *de novo* mutations in the genetic architecture of human diseases can be found in the paper by Veltman and Brunner [181].

Several of the studies mentioned in section 1.2 revealed that, together, *de novo* mutations affecting many different genes in different individuals might explain most rare neurodevelopmental diseases such as epilepsy [46, 59], intellectual disability [61], ASD [64, 67–69, 71], brain morphogenesis defects [73, 74], and psychiatric disorders [82, 86]. This *de novo* model for

complex neurodevelopmental genetic diseases essentially points to a monogenic basis of disease, with the mutation representing a single event of large effect. This contrasts with the multifactorial model, which invokes the interplay of many genetic and non-genetic factors of small effect in any individual patient. Thus, although it needs to be acknowledged that the phenotypic effect of any single mutation depends on the genetic background in which it occurs, the current overall picture is decidedly more monogenic than that envisaged just a few years ago [182]. The application of large-scale NGS studies demonstrates that many previously enigmatic sporadic syndromes, malformations, and diseases are due to *de novo* germline gene mutations, whereas others reflect somatic mosaicism for gene mutations.

1.6. Mosaic Mutations Accounting for a Significant Portion of Mutational Load in Rare Diseases

Until recently, genetic research was based on the premise that the mutations associated with human disease were present in all the cells of a patient. Increasingly however, evidence suggests that post-zygotic mutations occur much more frequently than previously thought, and may account for a significant portion of the mutational load causing human disease [183-193]. In fact, a subset of human diseases is obligatorily somatic. This is because constitutive mutations in certain genes are incompatible with embryonic development, whereas mosaicism allows development but causes very serious diseases, the etiology of which is hard to discern. Examples are McCune-Albright syndrome, Maffucci syndrome, and various chromosomal aneuploidy syndromes.

NGS has highlighted the role of somatic mosaicism in the development of rare diseases and neurodevelopmental diseases in particular [194]. Mosaicism refers to the existence within an individual of two genetically distinct populations of cells resulting from a post-zygotic mutation. It has been shown that during embryonic development, both point mutations and large deletions or insertions continuously accumulate in dividing cells. Somatic mutations may be overlooked or they may cause normal human variation or a rare genetic disease. They can also be transmitted to the next generation if their distribution pattern includes gonadal tissue. These mutations range from SNVs to whole chromosomes and have been implicated in numerous diseases, in particular cancer. The phenotypic consequences of somatic mosaicism depend on many factors, including the stage of development in which the muta-

tion occurs, the areas of the body affected, and the pathophysiological effect of the mutation. To date, mosaicism has been described in a range of rare diseases (primary immunodeficiencies, rheumatologic, hematologic disorders, *etc.*), but especially in neurodevelopmental disorders. This is because the probability of somatic mutation in neurons is greater than in other tissues due to the high rate of neuronal proliferation between weeks 4 and 24 of gestation (estimated at 105 divisions/minute) [195].

Somatic mosaic mutations in genes associated with severe diseases can result in highly enigmatic diseases that are very difficult to diagnose even with high-throughput sequencing. The difficulty lies not in the throughput but in the tissue from which the DNA is extracted. Recent technical advances have identified mosaic variants that cause many clinical phenotypes, underscoring the omnipresence of mosaicism. The influence of these variants on phenotype depends not only on their presence, but also on the specific tissues in which they are expressed. These observations represent the starting point of a research avenue that will be essential to better understand the molecular architecture of rare disease. Recently, Acuna-Hidalgo and coworkers reported that 6.5% of so-called *de novo* mutations were in fact mosaic mutations that had occurred post-zygotically [183]. Several research groups have demonstrated the high incidence of mosaicism in patients with brain morphogenesis disorders, particularly in the *LIS1*, *DCX*, *mTOR*, *PIK3R2*, *PIK3CA*, *AKT3*, *AKT1*, *FLNA*, and *TUBB2B* genes [75, 196-200], and in some cases restricted to brain tissue. Mosaic variants has also been found in epilepsy patients, especially those with Dravet (*SCN1A*) and Rett (*MECP2*, *CDKL5*) syndromes [201-204], *KCNQ2*-related epilepsy [205], X-linked early onset-epileptic encephalopathy caused by mutations in the *PCDH19* gene [206], and *SCN2A*-related epilepsy [207]. Cases of adult neurodegenerative diseases caused or modulated by somatic mutations have also been described, and include Alzheimer's disease [208, 209].

1.7. Digenic Inheritance

The power of NGS to elucidate the whole spectrum of variants in a given individual will also stimulate the discovery of digenic or polygenic disease causes as, after identifying what initially appears to be a disease-causing mutation, additional analyses can be carried out because the data are already available. A remarkable example includes the detection of heterozygous mutations in the two functionally related genes

GUCY1A3 and *CCT7* in an extended family with myocardial infarction [210]. Digenic inheritance is a phenomenon also seen in neurological diseases such as Parkinson disease with, for example, mutations in *PINK1* and *DJ-1* [211]. However, it remains to be proven that the combination of two mutations is, indeed, the cause of disease rather than the simple co-occurrence of two mutations by chance [212].

1.8. Co-occurrence of Two or More Genetic Diseases in the Same Patient

Before the explosion of NGS, it had never been postulated that a patient could have two or more rare diseases simultaneously. This year, however, Posey and colleagues carried out a retrospective analysis of data from 7374 consecutive unrelated patients who had been referred for molecular diagnostic by WES [213]. A molecular diagnosis was achieved for 2076 of these patients (28.2%). Surprisingly, 101 (4.9%) had diagnoses that involved two or more disease loci, and of these, 97 had two molecular diagnoses, three had three diagnoses, and one had four. According to the authors, this finding challenges the notion that a genetic investigation is complete once a single diagnosis is established. They also applied two models to investigate whether such a finding should be theoretically expected. The first model, a Poisson model, assumed that pathogenic variants arose independently at different loci within each patient's genome, and the second model, an independence model, used the observed rate of singleton diagnosis. Under both models, the observed proportion of patients with multiple molecular diagnoses (4.9%) was significantly lower than would be expected (14.0% according to the Poisson model and 26.4% according to the independence model). It could therefore be speculated that in at least a small proportion of rare diseases, the severe end of the clinical spectrum may be the consequence of this mechanism and that some such combinations may be lethal and thus escape detection. In other words, phenotype expansion of a rare disease might be influenced by such co-occurrences. The findings reported by Posey and coauthors suggest that any finding in a well-recognized syndrome that is reported only once or twice should be viewed with caution. Another study that supports co-occurrence of genetic disease is the one carried out in the FORGE and Care4Rare Canada WES initiatives, which retrospectively analyzed WES results for 802 undiagnosed probands referred for testing over the previous 5 years [214]. Of the 802 probands, 226 (28.2%) were diagnosed based on mutations in known disease genes. Eight (3.5%) had two or more genetic diagnoses that

explained their clinical phenotype, and seven of these had family members with one or more of the molecularly diagnosed diseases. Consanguinity and multisystem disease appeared to increase the likelihood of multiple genetic diagnoses within a family.

The most important conclusion to be drawn from these studies is the relevance of comprehensive clinical phenotyping of family members to ultimately provide accurate genetic counseling. Another important conclusion is that rare diseases that are thought to be novel (*i.e.*, unlike any other previously described conditions) may in fact be two rare diseases segregating in the same family. One example is the case of a Newfoundland family in which two siblings were thought to have a novel, variably penetrant syndrome characterized by ocular and skin hypopigmentation, congenital neutropenia, immune dysregulation, and Crohn's disease. Using WES, both siblings were shown to have severe congenital neutropenia type 4 but one of them also had oculocutaneous albinism type 4 [215]. It is likely that other "unique" phenotypes represent a conflation of two known phenotypes in this way [1]. Isolated examples of co-occurrence of two diseases have been reported. One of them, a boy presenting with severe muscular hypotonia, multiple fractures, and joint hyperflexibility, features that are compatible with mild osteogenesis imperfecta and hypemobility type Ehlers-Danlos syndrome [216] were found to carry a dominant *COL1A1* mutation associated with osteogenesis imperfecta and two recessive mutations in *TNXB* associated with Ehlers-Danlos syndrome.

Another case was uncovered when investigating the cause of disease in a male patient with typical features of mitochondrial disease, including infantile cataracts, chronic progressive external ophthalmoplegia, ptosis, progressive distal muscle weakness, and ataxia. WES showed a homozygous splice site mutation in *SETX*, which is known to cause SCA, autosomal recessive 1 (SCAR1). Additionally, a missense mutation was identified in a highly conserved position of the X-linked *OCRL* gene, which causes Lowe syndrome and Dent disease 2. Therefore, the patient did not have mitochondrial disease but rather overlapping symptoms of two different rare diseases mimicking this disease [217]. This finding raises an important question. Mitochondrial disease is one of the most common groups of inherited genetic diseases, with an incidence of 1/5000, but ~90% of cases do not have a DNA-based diagnosis. Could it be then that a significant percentage of what clinicians consider to be mitochondrial disease

is actually a combination of two or more different phenotypes?

Another illustrative example of co-occurrence is the case of a consanguineous family with 2 rare diseases: hereditary hypophosphatemic rickets and congenital myopathy, segregating independently. Phenotypic manifestations, linkage analysis, and homozygosity mapping yielded elusive results in this family because physicians assumed that it was a single rare disease. The mystery, however, was unravelled when WES identified two homozygous mutations in two genes, *SLC34A3* and *SEPN1*, which segregated in this family [218].

Combinations of diseases in a single patient can be replicated over time, as in Fitzsimmons' syndrome, a condition characterized by progressive spastic paraplegia, brachydactyly with cone-shaped epiphyses, short stature, dysarthria, and low-normal intelligence. This syndrome was recognized as a single entity until WES recently showed that it was two different diseases [219].

1.9. The Promise of Effective Treatments

Effective treatments are lacking for most rare diseases, largely because of the failure to identify a molecular cause. NGS, however, has opened the door not only to molecular diagnosis, but also to the search for treatments for diseases that in the past were a death sentence. Sometimes, the detection of a molecular cause can pinpoint an effective treatment. This is the case of many metabolic disorders in which diet can be used to maintain a controlled metabolic state. A more recent example is the discovery of *SLC18A2* as the causative gene for an infantile-onset movement disorder characterized by severe parkinsonism, non-ambulation, mood disturbance, autonomic instability, and developmental delay [220]. This gene encodes a translocator of dopamine and serotonin into synaptic vesicles, so the use of dopamine agonists resulted in a marked improvement in symptoms and the resumption of development. A similar case arose from the identification of the riboflavin transporter genes *SLC52A3* and *SLC52A2* as the cause of Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (progressive sensorineural deafness in combination with childhood amyotrophic lateral sclerosis). Subsequent treatment with riboflavin produced encouraging results in terms of both biomarker response and clinical endpoints [221]. Unfortunately, however, in most cases treatment cannot be inferred directly from a molecular defect.

Occasionally, a rare disease pathogenic pathway can overlap with one that is being targeted in common disorders. This phenomenon will occur with increasing frequency as the molecular 'atlas' of human pathology is completed and the modern pharmacopoeia grows, and is best exemplified by Marfan syndrome and the beneficial TGF β pathway modulation [222]. Another example is the study of the effect of kinase inhibitors originally formulated for cancer treatment on cardiac function in Noonan syndrome, an inherited kinasopathy caused by activation of the RAS signaling pathway [223].

When the origin of a rare disease lies in protein dosage problems (excess or defect), one effective approach could be to influence mRNA or protein levels. The identification of drugs that restore inadequate levels of mRNA or protein to a clinically significant level is a promising research avenue [224]. A second approach involves the use of increasingly detailed transcription factor binding-site maps that incorporate the majority of annotated genes. For a number of transcription factors, there are well-characterized, clinically approved agents that are expected to upregulate genes containing the transcription factor-binding site; the use of this information has led to potential therapeutics for spinal muscular atrophy [225, 226].

The future of rare disease treatment, however, undoubtedly lies in gene therapy. For many years, gene transfer trials have been associated with very few success stories, producing largely disappointing results and hit by major setbacks. However, the successful results achieved in ocular diseases and primary immune deficiencies have brought gene therapy back to the therapeutic front line [227, 228], and effective, long-lasting treatments from gene therapy trials are now being reported at an increasing pace. Positive results have been documented for a wide range of genetic diseases (including hematological, immunological, ocular, and neurodegenerative and metabolic disorders) and several types of cancer. To date, about 2000 clinical trials for various diseases have been completed or are ongoing, and many more are in the pipeline [229].

A promising form of gene therapy that has emerged forcefully in recent times is genome-editing technology, designed to either correct endogenous disease-causing genes or specifically target the integration of a therapeutic gene into a defined genetic locus. Such tools include zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated systems (CRISPR-Cas). These

engineered endonucleases can be programmed to specifically target and alter a DNA sequence by introducing a double-strand break. They can therefore be employed to correct a disease-causing mutation with great efficiency and represent a sophisticated tool for precision medicine. The CRISPR-Cas system, for instance, has been employed to study the effects of gene modifications in postmitotic neurons in the mouse brain and to correct a hereditary disease, tyrosinemia, in a mouse model [230, 231]. However, the current efficiency of gene editing may be subtherapeutic for certain diseases where edited cells have no proliferative or survival advantage, and off-target double strand breaks may induce genotoxicity. These gene-editing tools therefore need further refinement before they can be safely and effectively used in the clinic.

1.10. Implementation of NGS in Neonatal Intensive Care Units

Rare diseases often present in the first days or weeks of life and may require complex management in the setting of a neonatal intensive care unit (NICU). Both diagnostic yield and speed are important considerations in neonatal care. In this context, the impact of WES/WGS can perhaps be compared with what happened when Guthrie cards were replaced by mass spectrometry. The fundamental premise is that application of NGS as early as possible can have high clinical impact.

Some experiences of genomic implementation in NICUs have been reported. The Children's Mercy Hospital Kansas City, for example, applied WGS to a select population of ill infants in a level IV NICU [232, 233]. They reported a diagnostic rate of 57%, which contrasted sharply with the rate 9% achieved with standard genetic testing ($p=0.0002$). Most of the diagnoses altered the management of patients, and 65% were associated with *de novo* mutations. Acute clinical usefulness was noted in 65% of patients, 20% had diagnoses with strongly favorable effects on management, and 30% were started on palliative care. Diagnoses like these may lead to clinical management changes ranging from transition to palliative care for uniformly lethal conditions to modification or initiation of medical or surgical therapy to improve outcomes in others.

The NICU at the Children's Hospital of Eastern Ontario used a gene panel with clinically relevant genes to test 20 newborns, 8 of whom received a diagnosis [234]. The authors stated that such an approach alters health care delivery in these units and that even a 10-20% success rate is invaluable if it allows for an

intervention window that would otherwise be non-existent. Because disease progression is extremely rapid, albeit heterogeneous, in newborns, molecular diagnoses must occur quickly to be relevant for clinical decision-making. Saunders *et al.* [235] describe 50-hour differential diagnosis of genetic disorders by WGS that features automated bioinformatic analysis and is intended to be a prototype for use in NICUs. Retrospective 50-hour WGS identified known molecular diagnoses in two children, while prospective WGS identified a potential molecular diagnosis of a severe *GJB2*-related skin disease in one neonate and *BRAT1*-related lethal neonatal rigidity and multifocal seizure syndrome in another. It also identified *BCL9L* as a novel, recessive visceral heterotaxy gene (*HTX6*) in a pedigree and ruled out known candidate genes in one infant. Sequencing of parents or affected siblings expedited the identification of disease genes in prospective cases. Thus, rapid WGS can potentially broaden and foreshorten differential diagnosis, resulting in fewer empirical treatments and faster progression to genetic and prognostic counseling [235].

2. LIMITATIONS AND CHALLENGES OF NGS TECHNOLOGIES

Despite its enormous strengths and potential, NGS also has limitations and challenges. First and foremost, NGS provides horizontal coverage and accuracy rates <100%, resulting thus in missing variants and false-positive results. Another challenge is related to the filtering and interpretation of data; as more than one candidate variant is usually found. Indeed, the greater the number of kilobases sequenced, the greater the chance of finding more candidates. There are also ethical challenges related to incidental findings and how to guide unaffected probands seeking direct-to-customer testing. There is thus an urgent need to define standards for run quality, variant interpretation, and quality control.

2.1. Demonstration of Causality of a Variant

When geneticists are looking for a molecular diagnosis and find a likely pathogenic variant(s) in a known gene that is associated with a similar phenotype to that of the patient being studied and has an appropriate mode of inheritance based on the family history (*de novo* for a dominant disorder with healthy parents, cosegregation of variant for a dominant familial disorder or in trans couple of variants in a recessive gene), they can be confident that they are close to a diagnosis. However, when the variant found is in a gene that has never been associated with disease or in a gene previously associated with a different phenotype, then they

engineered endonucleases can be programmed to specifically target and alter a DNA sequence by introducing a double-strand break. They can therefore be employed to correct a disease-causing mutation with great efficiency and represent a sophisticated tool for precision medicine. The CRISPR-Cas system, for instance, has been employed to study the effects of gene modifications in postmitotic neurons in the mouse brain and to correct a hereditary disease, tyrosinemia, in a mouse model [230, 231]. However, the current efficiency of gene editing may be subtherapeutic for certain diseases where edited cells have no proliferative or survival advantage, and off-target double strand breaks may induce genotoxicity. These gene-editing tools therefore need further refinement before they can be safely and effectively used in the clinic.

1.10. Implementation of NGS in Neonatal Intensive Care Units

Rare diseases often present in the first days or weeks of life and may require complex management in the setting of a neonatal intensive care unit (NICU). Both diagnostic yield and speed are important considerations in neonatal care. In this context, the impact of WES/WGS can perhaps be compared with what happened when Guthrie cards were replaced by mass spectrometry. The fundamental premise is that application of NGS as early as possible can have high clinical impact.

Some experiences of genomic implementation in NICUs have been reported. The Children's Mercy Hospital Kansas City, for example, applied WGS to a select population of ill infants in a level IV NICU [232, 233]. They reported a diagnostic rate of 57%, which contrasted sharply with the rate 9% achieved with standard genetic testing ($p=0.0002$). Most of the diagnoses altered the management of patients, and 65% were associated with *de novo* mutations. Acute clinical usefulness was noted in 65% of patients, 20% had diagnoses with strongly favorable effects on management, and 30% were started on palliative care. Diagnoses like these may lead to clinical management changes ranging from transition to palliative care for uniformly lethal conditions to modification or initiation of medical or surgical therapy to improve outcomes in others.

The NICU at the Children's Hospital of Eastern Ontario used a gene panel with clinically relevant genes to test 20 newborns, 8 of whom received a diagnosis [234]. The authors stated that such an approach alters health care delivery in these units and that even a 10-20% success rate is invaluable if it allows for an

intervention window that would otherwise be nonexistent. Because disease progression is extremely rapid, albeit heterogeneous, in newborns, molecular diagnoses must occur quickly to be relevant for clinical decision-making. Saunders *et al.* [235] describe 50-hour differential diagnosis of genetic disorders by WGS that features automated bioinformatic analysis and is intended to be a prototype for use in NICUs. Retrospective 50-hour WGS identified known molecular diagnoses in two children, while prospective WGS identified a potential molecular diagnosis of a severe *GJB2*-related skin disease in one neonate and *BRAT1*-related lethal neonatal rigidity and multifocal seizure syndrome in another. It also identified *BCL9L* as a novel, recessive visceral heterotaxy gene (*HTX6*) in a pedigree and ruled out known candidate genes in one infant. Sequencing of parents or affected siblings expedited the identification of disease genes in prospective cases. Thus, rapid WGS can potentially broaden and foreshorten differential diagnosis, resulting in fewer empirical treatments and faster progression to genetic and prognostic counseling [235].

2. LIMITATIONS AND CHALLENGES OF NGS TECHNOLOGIES

Despite its enormous strengths and potential, NGS also has limitations and challenges. First and foremost, NGS provides horizontal coverage and accuracy rates <100%, resulting thus in missing variants and false-positive results. Another challenge is related to the filtering and interpretation of data; as more than one candidate variant is usually found. Indeed, the greater the number of kilobases sequenced, the greater the chance of finding more candidates. There are also ethical challenges related to incidental findings and how to guide unaffected probands seeking direct-to-customer testing. There is thus an urgent need to define standards for run quality, variant interpretation, and quality control.

2.1. Demonstration of Causality of a Variant

When geneticists are looking for a molecular diagnosis and find a likely pathogenic variant(s) in a known gene that is associated with a similar phenotype to that of the patient being studied and has an appropriate mode of inheritance based on the family history (*de novo* for a dominant disorder with healthy parents, cosegregation of variant for a dominant familial disorder or in trans couple of variants in a recessive gene), they can be confident that they are close to a diagnosis. However, when the variant found is in a gene that has never been associated with disease or in a gene previously associated with a different phenotype, then they

are faced with a problem. It is incredibly difficult to prove causality for any mutation in a novel gene when there is only one affected individual. While finding rare variants that may be damaging in a compound heterozygous or *de novo* state can be a good first step for linking a gene to a disease, ultimately, functional studies, additional families, co-segregation and other genetic analysis are essential to support the link. It is accepted by the international scientific community that a prerequisite for new disease gene identification is the detection of more than one mutation in a gene in more than one pedigree. One obstacle in this regard, however, is the fragmented distribution of patients across institutions. One of the problems associated with NGS is the inability to share sequencing data quickly and universally. Standards and bioinformatic tools are needed to create international repositories of clinical and NGS results provided by families and scientists for comparison purposes. This problem can be circumvented by tools already created for and by the internet and social media. This point is well illustrated in several studies [17, 236-238].

Another handicap that has to be taken into account is the fact that some genes are dispensable, meaning that variants truncating in even one of these genes can lead to erroneous categorization of variant pathogenicity.

2.2. Demonstration of Causality of a Variant

There are many known neurogenetic disorders involving trinucleotide repeat expansion, such as Huntington's disease, fragile X syndrome, and Friedreich's ataxia. Expanded repeats range from small expansions of 20-100 copies to larger expansions of up to several thousand units. Most NGS technologies rely on reading signals from bulk DNA populations, and they are limited by the loss of sequence phase coherence—a particular problem for GC-rich sequences—as well as decreasing size resolution with increasing DNA length [239]. Due to the short length of reads NGS technology is, at least for the moment, unable to detect dynamic trinucleotide expansions. However, third-generation sequencing technology may overcome this limitation. SMRT, single-molecule, real-time sequencing, uses a zero-mode waveguide (single molecule of DNA) as a template [240] and sequencing reads are only limited by loss of activity of individual polymerase molecules. Read lengths can be as high as 15 kb (average of 3 kb) [241]. In a study of SMRT technology, Loomis and colleagues determined that it was possible to generate sequence data for *FMRI* (the hu-

man fragile X mental retardation 1 gene) alleles in excess of 750 CGG repeats, which translates to over 2.25 kb of 100% CGG-repeat DNA [239].

2.3. Missed Coding Variants

2.3.1. GC-rich Exons

In terms of capture efficiency, an important subset of GC-rich exons of the coding genes is missed in NGS studies. Accordingly, causative disease mutations present in these regions will be missed, producing a false-negative result, and the second-best gene, which may not be the gene of interest, may be falsely implicated. Because there is frequently more than one candidate gene, missing the actual gene may result in both a false-negative and a false-positive result.

2.3.2. Highly Homologous Regions

Coverage shortfalls generated by the presence of highly homologous regions are another limitation of NGS technology. Although these regions are captured and covered by multiple reads, QC filters discard them because the same read can be aligned in multiple different regions. Therefore, coverage drops and variants present in those regions may be missed. Alignment without QC filtering can be used in order not to eliminate these reads and detect variants, although in such a case it will not be possible to determine the specific region to which a variation belongs. This problem could be resolved as read length progressively increases. At present, duplications can be solved only by amplifying each specific region using specific primers placed in a non-homologous site at the edge of the region, and then, sequencing each amplification by Sanger using internal primers or by NGS using a purpose-prepared library with the specific PCR without any additional capturing.

2.3.3. Bioinformatic Limitations

Computational algorithms used at all stages, be it alignment, variant calling, or annotation, are still subject to final optimization. Different software packages may result in different final interpretations, and different thresholds for statistical significance and variant calling would produce a different final list of putative genes.

2.3.4. Lack of International and Reliable Databases

Prediction strength in NGS is dependent on the comprehensiveness of the databases containing both the filtering negative genes and the annotating positive genes. Large numbers of variants are identified when

large panels, such as exome panels, are used. Even after filtering, it is still very challenging to differentiate mutations from rare polymorphisms. However, as more and more exomes and genomes are sequenced, population-based filtering will become increasingly helpful. Newer algorithms based on hundreds or even thousands of samples at a time will help to reduce error rates.

2.4. Missed Variants in Non-Coding Regions

NGS assays available in diagnostic units (*i.e.*, genes panels and WES rather than WGS tools) are limited to known coding regions of the human genome. Exome sequences account for just 1% of the genome and it is therefore only logical that many disease-causing mutations will be missed. According to data from the ENCODE project, about 80% of the human genome may have a regulatory role [242]. Thus, with usual assays one can lose potential protein-coding regions that have not yet been annotated as genes, as well as regulatory regions, such as non-coding RNAs (or transcription factor binding sites). Many splicing mutations are missed in clinical settings due to the limitations of *in silico* prediction algorithms or because they are located in non-coding regions. Subtle changes in splice site variations, 3' untranslated regulatory regions, non-coding RNAs, and direct interaction of transcription factors may have significant effects on gene expression patterns that can only be assessed by transcriptome interrogation.

When applying NGS to DNA and RNA simultaneously, we can scan for potential disease-causing variations in non-coding DNA, and at the same time learn about the functional implications of genomic changes with the additional benefit of learning about transmission of alleles and potential imbalance in chromosome X expression due to skewed X chromosome inactivation. Such an approach can reveal genotype-phenotype correlations, highlight gene expression profiles associated with the genetic condition being studied, and allow immediate evaluation by *in silico* prediction algorithms of the effect genomic variants have on gene expression, alternative splicing, exon usage, and gene fusions [243]. Transcriptome assessment has led to the identification of small, single-stranded RNA molecules, such as microRNA (miRNA) and short, interfering RNA (siRNA) [244]. Small RNAs are short non-coding RNAs that regulate translation of their target messenger RNAs (mRNA) through mRNA degradation or suppression of translation. Advantages of miRNAs are their relative chemical stability, which facilitates

miRNA isolation and analyses from clinical samples. Some miRNAs are actively secreted in exosomes and can be measured in blood specimens, rendering miRNAs targets for biomarker discovery [245]. Specifically designed siRNAs block miRNA action and may have therapeutic potential [246].

This year provided us with two examples of the use of transcriptome to solve rare disease diagnosis. The first was that of the large consanguineous family with an autosomal recessive SCA discussed in the movement disorders section [93]. Two months later, there was a report of an individual with sporadic atypical spinal muscular atrophy in whom clinical DNA sequencing identified one pathogenic *ASAH1* missense mutation. Transcriptome sequencing of patient leukocytes identified a highly significant and atypical *ASAH1* isoform not explained by the mutation found. Subsequent Sanger sequencing identified the mutation responsible for the alternative splicing (c.504A>C; p. Lys168Asn) and provided a molecular diagnosis of autosomal-recessive spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy [247].

2.5. Missed Variants in Somatic Mosaicism

We mentioned earlier on that one of the milestones achieved with the use of NGS was the discovery of the important role that mosaic mutations play in the development of rare diseases. NGS, however, only can detect mosaic mutations if: 1) the test achieves high coverage and 2) if the somatic mutation is present in blood cells, since genetic analysis is usually performed with DNA extracted from these cells. However, even mosaic mutations present in blood tissue can be difficult to detect because, unfortunately, the resulting genetic material is unstable due to the multiple rounds of self-renewal to which it is subjected during hematopoiesis. In addition, the diversity of clonal lines that give rise to circulating blood cells decreases with age. Thus, the selective effects of certain mutations, whether positive or negative, can bias the frequency of a mutation in the blood compared with in the rest of the body. One example is the iso-chromosome 12p, which is undetectable in blood, but detectable in samples of ectodermal origin.

In neurodevelopment diseases, where mutations may only be present in tissues of ectodermal origin, the largest challenge for detecting mosaicism lies in testing the actual tissue in which the mutation is present. Levels of mosaicism in different tissues and locations can also vary considerably, even within the same gemline. These variations are probably a result of a combination

of factors, such as the moment at which the mutation occurs, cell migration and determination during development, and selective effects that occur in specific tissue types. To overcome these limitations, we must investigate the use of other sources of DNA for genetic analyses (e.g. buccal cells, hair roots, skin fibroblasts), and implement and optimize these approaches as key tools in routine genetic analyses.

2.6. Missed Epigenetic Mutations

Epigenetic modifications provide a system of gene regulation that allows clonally heritable yet reversible alterations in gene transcription. Errors in this complex system can give rise to abnormal gene silencing, known as *epimutation*; importantly, this can occur in the absence of an underlying genetic defect. Epimutations are commonly somatic events, and are particularly prevalent in tumors, but Suter and others [248, 249] have shown that they can also arise in the germline, giving rise to soma-wide transcriptional silencing of a gene. A germline epimutation can mimic the effect of an inactivating mutation, and in doing so, phenocopy a genetic disease. Evidence that this mechanism occurs in humans was recently provided by Suter *et al.* [248], who identified individuals in whom one allele of the gene encoding the DNA mismatch-repair protein *MLH1* was epigenetically silenced throughout the soma (implying a germline event). These individuals had hereditary nonpolyposis colorectal cancer but did not have any identifiable mutation in *MLH1*, but it is silenced, which demonstrates that an epimutation can phenocopy a genetic disease.

WGS, WES, and gene panels cannot capture epigenetic phenomena. Other orthogonal technologies such as RNA-seq or ChIP-seq can detect gene fusions, expression differences, or changes in regulatory regions that are missed by exome sequencing alone. A small number of studies have performed detailed analyses of epigenetic events and their role in neurological disease. Most of these studies have examined methylation patterns and their role in gene expression and ultimately phenotype. For example, different levels of methylation of the ataxin 2 (*ATXN2*) gene promoter were found to be associated with disease development in a family with SCA type 2 [250]. Another example can be found in the *RYR1* gene, associated with myopathy, which had never been thought to be affected by epigenetic regulation. In 2008, during the mutation analysis of a cohort of patients, Zhou *et al.* discovered that *RYR1* was transcribed from just one allele (*i.e.*, monoallelic expression) in skeletal muscle in a proportion of the

patients. The transcribed allele in skeletal muscle carried a recessive mutation. Surprisingly, transcription analysis of patient fibroblasts and lymphoblastoid cell lines indicated biallelic transcription, suggesting tissue-specific allele silencing [251, 252]. These results suggest that recessive *RYR1* mutations in a proportion of patients with core myopathies may be unveiled by lack of expression of the other, apparently wild-type, allele. Various lines of experimental evidence suggest that this is due to genomic imprinting in these patients, although other epigenetic modification of allele expression cannot be definitively excluded. These data indicate that *RYR1* undergoes polymorphic, tissue-specific, and developmentally regulated allele silencing and that this unveils recessive mutations. The question that arises is: how many patients with genetic recessive diseases in which only one mutation has been found might have an epimutation that leads to the silencing of the healthy allele in a critical tissue? Only transcriptomic analysis of the affected tissue can reveal this kind of genetic mutation.

2.7. Ethical Challenges

Exome and genome sequencing has raised numerous ethical issues that have not yet been fully resolved. One major area of debate concerns the question of which results should be returned to a patient and in what context. Genetic sequencing may confirm the presence of the pathogenic variant being investigated, but it may also return incidental findings that may be relevant to the patient's current or future health yet unrelated to the initial line of questioning. Often, these incidental findings may be of unclear significance. Other concerns include how to best obtain adequate informed consent from the individuals submitting testing samples, and how to allow for data sharing among researchers while protecting individuals' privacy. These concerns are further complicated by the fact that exome sequencing may be undertaken in a clinical setting or as part of a research study. The ethics of data return to patients are less clear cut in the second case.

CONCLUSION

There is no doubt that NGS technologies have constituted a turning point in rare disease research, diagnosis, and treatment. Findings to date have provided a glimpse into the age of genomic medicine and into how our understanding of human disease will change. Although many rare diseases are still without treatment, a diagnosis itself can mean great relief for patients and families. By understanding what is happening to their

child and why, for example, parents can stop going from doctor to doctor in search of an answer, contact other parents with children in the same circumstances, form an idea of their child's prognosis, and access genetic counselling for family planning. Diagnosis is a necessary step for gaining control of one's situation and learning to accept it. The above reasons alone are more than sufficient to illustrate the impact that NGS technologies have had in the rare disease community.

Nevertheless, the journey has only begun and much work remains to overcome current challenges and increase the diagnostic power of NGS technologies. Full-coverage genomic studies accompanied by other modalities, such as methylome, transcriptome, and proteome and functional studies will help in this respect. The creation of reliable, accessible databases of genotypic and genomic information linked to clinical information is also essential for advancing knowledge. This is an enormous endeavor that will require global cooperation involving the sharing of vast amounts of data between many countries. Nonetheless, we have already embarked on this path of exponential growth and endless possibilities and we must not let this path become blocked by our failure to resolve the important ethical questions posed by the systematic use of new genomic tools.

Another important conclusion to be drawn from this work is that genomic science is cross-sectional, i.e., it cannot be understood as a single service provided to a patient with a suspected genetic disorder at the end of the diagnostic process. The main clinical departments should have their own head of genomics who, in conjunction with clinical, biochemical, and pathology specialists, can interpret genomic data at the beginning of the diagnostic process.

In sum, the implementation of NGS tools is imperative in the best health systems worldwide. There is no longer any excuse for diagnostic odysseys.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (FIS-P113/02177).

REFERENCES

- [1] Boycott, K.M.; Vanstone, M.R.; Bulman, D.E.; MacKenzie, A.E. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*(10), 681-691.
- [2] Danielsson, K.; Mun, L.J.; Lordemann, A.; Mao, J.; Lin, C.H. Next-generation sequencing applied to rare diseases genomics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*(4), 469-487.
- [3] Bacchelli, C.; Williams, H.J. Opportunities and technical challenges in next-generation sequencing for diagnosis of rare pediatric diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2016**, *16*(10), 1073-1082.
- [4] Arif, B.; Kumar, K.R.; Seibler, P.; Vulinovic, F.; Fatima, A.; Winkler, S.; Nürnberg, G.; Thiele, H.; Nürnberg, P.; Jamil, A.Z.; Brüggemann, A.; Abbas, G.; Klein, C.; Nae, S.; Lohmann, K. A novel OPA3 mutation revealed by exome sequencing: An example of reverse phenotyping. *JAMA Neurol.* **2013**, *70*(6), 783-787.
- [5] Urreiziti, R.; Cueto-Gonzalez, A.M.; Franco-Valh, H.; Mort-Farre, S.; Roca-Ayats, N.; Ponomarenko, J.; Cozzuto, L.; Company, C.; Bosio, M.; Ossowski, S.; Montfort, M.; Hecht, J.; Tizzano, E.F.; Cormand, B.; Vilageliu, L.; Opitz, J.M.; Neri, G.; Grinberg, D.; Balcells, S. A de novo nonsense mutation in MAGEL2 in a patient initially diagnosed as opitz-C: similarities between schauf-yung and opitz-C syndromes. *Sci Rep.* **2017**, *10*(7) 44138.
- [6] Graziano, C.; Wischmeijer, A.; Pippucci, T.; Fusco, C.; Diquigiovanni, C.; Nötkas, M.; Saak, M.; Kurg, A.; Rivieri, F.; Blau, N.; Hoffmann, G.F.; Chaubey, A.; Schwartz, C.E.; Romeo, G.; Bonora, E.; Garavelli, L.; Seri, M. Syndromic intellectual disability: a new phenotype caused by an aromatic amino acid decarboxylase gene (DDC) variant. *Gene*, **2015**, *559*(2), 144-148.
- [7] Zhang, L.; McFarkland, K.N.; Subramony, S.H.; Heilman, K.M.; Ashizawa, T. SPG7 and impaired emotional communication. *Cerebellum* **2017**, *16*(2), 595-598.
- [8] Coutais, A.; Coppitien, W.; Boun, V.; Defraigne, J.O.; Colige, A.; Sakalhasan, N. A novel SMAD3 mutation caused multiple aneurysms in a patient without osteoarthritis symptoms. *Eur. J. Med. Genet.* **2017**, *60*(4), 228-231.
- [9] Hieracant, J.; Komara, M.; Nagi, A.; Al-Zaabli, O.; Fathallah, W.; Cui, H.; Yang, Y.; Eng, C.M.; Al Sorkhy, M.; Ghattas, M.A.; Al-Gazali, L.; Ali, B.R. A de novo mutation in the X-linked PAK3 gene is the underlying cause of intellectual disability and macrocephaly in monozygotic twins. *Eur. J. Med. Genet.* **2017**, *60*(4), 212-216.
- [10] Liu, H.; Sawyer, S.L.; Gos, M.; Grynspan, D.; Issa, K.; Ramphal, R.; Rotaru, C.; Majewski, J.; Boycott, K.M.; Graham, G.; Bronwlich, M. Atypical fibrodysplasia ossificans progressiva diagnosed by whole-exome sequencing. *Am. J. Med. Genet. A.* **2015**, *167*(6), 1337-1341.
- [11] Bamshad, M.J.; Ng, S.B.; Bigham, A.W.; Taher, H.K.; Emond, M.J.; Nickerson, D.A.; Shendure, J. Exome sequencing as a tool for mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*(11), 745-755.
- [12] Wothley, E.A.; Mayer, A.N.; Syverson, G.D.; Helbling, D.; Bonacci, B.B.; Decker, B.; Serpe, J.M.; Danu, T.; Tschannen, M.R.; Veith, R.L.; Bashore, M.J.; Broeckel, U.; Tomita-Mitchell, A.; Awa, M.J.; Casper, J.T.; Margolis, D.A.; Bick, D.P.; Hesser, M.J.; Routes, J.M.; Vebis, J.W.; Jacob, H.J.; Dimmock, D.P. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet. Med.* **2011**, *13*(3), 255-262.

- [13] Ng, S.B.; Buckingham, K.J.; Lee, C.; Bigham, A.W.; Tabor, H.K.; Dent, K.M.; Huff, C.D.; Shannon, P.T.; Jabs, E.W.; Nickerson, D.A.; Shendure, J.; Bamshad, M.J. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.*, 2010, 42(1), 30-35.
- [14] Ng, S.B.; Bigham, A.W.; Buckingham, K.J.; Hannibal, M.C.; McMillin, M.J.; Gilchrist, H.L.; Beck, A.E.; Tabor, H.K.; Cooper, G.M.; Mefford, H.C.; Lee, C.; Turner, E.H.; Smith, J.D.; Rieder, M.J.; Yoshiura, K.; Matsumoto, N.; Ohta, T.; Niihara, N.; Nickerson, D.A.; Bamshad, M.J.; Shendure, J. Exome sequencing identifies ML12 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.*, 2010, 42(9), 790-793.
- [15] Hoischen, A.; van Bon, B.W.; Gilissen, C.; Arts, P.; van Lier, B.; Stehouwer, M.; de Vries, P.; de Reuver, R.; Wienskamp, N.; Mortier, G.; Devriendt, K.; Amorim, M.Z.; Revencu, N.; Kidd, A.; Barbosa, M.; Turner, A.; Smith, J.; Oley, C.; Henderson, A.; Hayes, I.M.; Thompson, E.M.; Brunner, H.G.; de Vries, B.B.; Veltman, J.A. De novo mutations of SETBP1 cause Schinz-Golden syndrome. *Nat. Genet.*, 2010, 42(6), 483-485.
- [16] Gilissen, C.; Arts, H.H.; Hoischen, A.; Spruijt, L.; Mans, D.A.; Arts, P.; van Lier, B.; Stehouwer, M.; van Roozwijk, J.; Kant, S.G.; Roepman, R.; Knoers, N.V.; Veltman, J.A.; Brunner, H.G. Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sengers-Brener syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010, 87(3), 418-423.
- [17] Need, A.C.; Shashi, V.; Hiromi, Y.; Schoch, K.; Shianna, K.V.; McDonald, M.T.; Meisler, M.H.; Goldstein, D.B. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J. Med. Genet.*, 2012, 49(6), 353-361.
- [18] Gahl, W.A.; Markello, T.C.; Toro, C.; Fajardo, K.F.; Sincan, M.; Gill, F.; Carlson-Donohoe, H.; Gropman, A.; Pieron, T.M.; Golas, G.; Wolfe, L.; Groden, C.; Godfrey, R.; Nehrbeck, M.; Wahl, C.; Landis, D.M.; Yang, S.; Madeo, A.; Mullikin, J.C.; Boerkoel, C.F.; Tiff, C.J.; Adams, D. The National Institutes of Health Undiagnosed Diseases Program: insights into rare diseases. *Genet. Med.*, 2012, 14(1), 51-59.
- [19] Yang, Y.; Muzny, D.M.; Reid, J.G.; Bainbridge, M.N.; Willis, A.; Ward, P.A.; Braxton, A.; Beuten, J.; Xia, F.; Niu, Z.; Hudson, M.; Person, R.; Bekheirnia, M.R.; Leduc, M.S.; Kirby, A.; Pham, P.; Scull, J.; Wang, M.; Ding, Y.; Plon, S.E.; Lupski, J.R.; Beaudet, A.L.; Gibbs, R.A.; Eng, C.M. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 369(16), 1502-1511.
- [20] Yang, Y.; Muzny, D.M.; Xia, F.; Niu, Z.; Person, R.; Ding, Y.; Ward, P.; Braxton, A.; Wang, M.; Buhay, C.; Veeraraghavan, N.; Hawes, A.; Chiang, T.; Leduc, M.; Beuten, J.; Zhang, J.; He, W.; Scull, J.; Willis, A.; Landsverk, M.; Craigen, W.J.; Bekheirnia, M.R.; Stray-Pederson, A.; Liu, P.; Wen, S.; Akcaraz, W.; Cui, H.; Walkiewicz, M.; Reid, J.; Bainbridge, M.; Patel, A.; Boerwinkle, E.; Beaudet, A.L.; Lupski, J.R.; Plon, S.E.; Gibbs, R.A.; Eng, C.M. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*, 2014, 312(18), 1870-1879.
- [21] Farwell, K.D.; Shalmizadi, L.; El-Khechen, D.; Powis, Z.; Chao, E.C.; Tippin Davis, B.; Baxter, R.M.; Zeng, W.; Mroske, C.; Parra, M.C.; Gandomi, S.K.; Lu, I.; Li, X.; Lu, H.; Lu, H.M.; Salvador, D.; Ruble, D.; Lao, M.; Fischbach, S.; Wen, J.; Lee, S.; Elliott, A.; Danlop, C.L.; Tang, S. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet. Med.*, 2015, 17(7), 578-586.
- [22] Sawyer, S.L.; Hartley, T.; Dymont, D.A.; Beaulieu, C.L.; Schwartzentruber, J.; Smith, A.; Bedford, H.M.; Bernard, G.; Bernier, F.P.; Brais, B.; Bulman, D.E.; Warman Chardon, J.; Chitayat, D.; Deladoey, J.; Fernandez, B.A.; Frosk, P.; Geraghty, M.T.; Gerull, B.; Gibson, W.; Gow, R.M.; Graham, G.E.; Green, J.S.; Haon, E.; Horvath, G.; Irnes, A.M.; Jabado, N.; Kim, R.H.; Koeneke, R.K.; Khan, A.; Lehmann, O.J.; Mendoza-Londono, R.; Michaud, J.L.; Nikkel, S.M.; Penney, L.S.; Polychronakos, C.; Richer, J.; Rouleau, G.A.; Samuels, M.E.; Siu, V.M.; Suchowersky, O.; Tamopolsky, M.A.; Yoon, G.; Zahir, F.R.; Majewski, J.; Boycott, K.M. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin. Genet.*, 2016, 89(3), 275-284.
- [23] Iglesias, A.; Anyane-Yeboah, K.; Wynn, J.; Wilson, A.; Truitt Cho, M.; Guzman, E.; Sisson, R.; Egan, C.; Chung, W.K. The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. *Genet. Med.*, 2014, 16(12), 922-931.
- [24] Neveling, K.; Feenstra, I.; Gilissen, C.; Hoefnoot, L.H.; Kamsteeg, E.J.; Mensink, A.R.; Rodenburg, R.J.; Yntema, H.G.; Spruijt, L.; Vermeir, S.; Rime, T.; van Gassen, K.L.; Bodmer, D.; Lugtenberg, D.; de Reuver, R.; Buijsman, W.; Derks, R.C.; Wienkamp, N.; van den Heuvel, B.; Ligtgenberg, M.J.; Kremer, H.; Koolen, D.A.; van de Warrenburg, B.P.; Cremers, F.P.; Marcini, C.L.; Smeitink, J.A.; Wortmann, S.B.; van Zelt-Sims, W.A.; Veltman, J.A.; Brunner, H.G.; Scheffer, H.; Nelen, M.R. A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum. Mutat.*, 2013, 34(12), 1721-1726.
- [25] DiLella, A.G.; Marvik, J.; Brayton, K.; Woo, S.L. An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature*, 1987, 327(6120), 333-336.
- [26] Anikster, Y.; Haack, T.B.; Vilhoux, T.; Podo-Shakked, B.; Thöny, B.; Shen, N.; Guarani, V.; Meisner, T.; Mayatepek, E.; Trefz, F.K.; Mark-Yagel, D.; Martinez, A.; Hutlin, E.L.; Paulo, J.A.; Berutti, R.; Benoist, J.F.; Imbard, A.; Dobosz, I.; Heimer, G.; Landau, Y.; Ziv-Strasser, L.; Mafudan, M.C.; Gemperle-Brischig, C.; Cremer, K.; Engels, H.; Meili, D.; Keller, I.; Bruggmann, R.; Strom, T.M.; Meisinger, T.; Mullikin, J.C.; Schwartz, G.; Ben-Zeev, B.; Gahl, W.A.; Harper, J.W.; Blau, N.; Hoffmann, G.F.; Prokisch, H.; Opladen, T.; Schiff, M. Biallelic mutations in DNAJC12 cause hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, 2017, 100(2), 257-266.
- [27] Edvardson, S.; Yi, J.K.; Jalas, C.; Xu, R.; Webb, B.D.; Snider, J.; Fedick, A.; Kleinman, E.; Trefz, N.R.; Mao, C.; Elpeleg, O. Deficiency of the alkaline ceramidase ACER3 manifests in early childhood by progressive leukodystrophy. *J. Med. Genet.*, 2016, 53(6), 389-396.
- [28] Tarailo-Graovac, M.; Shyr, C.; Ross, C.J.; Horvath, G.A.; Sahvarinova, R.; Ye, X.C.; Zhang, L.H.; Bhavarr, A.P.; Lee, J.J.; Drögemöller, B.L.; Abdelayed, M.; Alfadhi, M.; Armstrong, L.; Baumgartner, M.R.; Burda, P.; Connolly, M.B.; Cameron, J.; Demos, M.; Dewan, T.; Diome, J.; Evans, A.M.; Friedman, J.M.; Garber, I.; Lewis, S.; Ling, J.; Mandal, R.; Mattman, A.; McKinnon, M.; Michoudas, A.; Metzger, D.; Ogunbayo, O.A.; Rakic, B.; Rozmus, J.; Ruben, P.; Sayson, B.; Santra, S.; Schultz, K.R.; Selby, K.; Shchel, P.; Sims, S.; Skrypnik, C.; Superti-Furga, A.; Turvey, S.E.; Van Allen, M.I.; Wishart, D.; Wu, J.; Wu, J.

- Zafeiriou, D.; Kluijtmans, L.; Wevers, R.A.; Eydoux, P.; Lehman, A.M.; Valance, H.; Stockler-Ipsiroglu, S.; Sinclair, G.; Wasserman, W.W.; van Kamebeek, C.D. Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders. *N. Engl. J. Med.*, 2016, 374(23), 2246-2255.
- [29] Haack, T.B.; Danhauser, K.; Haberberger, B.; Hoser, J.; Strecker, V.; Boehm, D.; Uziel, G.; Lamantia, E.; Invernizzi, F.; Poulton, J.; Rolinski, B.; Iuso, A.; Biskup, S.; Schmidt, T.; Mewes, H.W.; Wittig, I.; Meitinger, T.; Zeviani, M.; Prokisch, H. Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat. Genet.*, 2010, 42(12), 1131-1134.
- [30] Haack, T.B.; Haberberger, B.; Frisch, E.M.; Wieland, T.; Iuso, A.; Gorza, M.; Strecker, V.; Graf, E.; Mayer, J.A.; Herberg, U.; Hennemann, J.B.; Klopstock, T.; Kuhn, K.A.; Ahning, U.; Speid, W.; Wilchowski, E.; Hoffmann, G.F.; Tsanava, M.; Hanslova, H.; Zeman, J.; Plecko, B.; Zeviani, M.; Wittig, I.; Strom, T.M.; Schuelke, M.; Freisinger, P.; Meitinger, T.; Prokisch, H. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J. Med. Genet.*, 2012, 49(4), 277-283.
- [31] Calvo, S.E.; Compton, A.G.; Herdman, S.G.; Lim, S.C.; Lieber, D.S.; Tucker, E.J.; Laskowski, A.; Garone, C.; Liu, S.; Jaffe, D.B.; Christodoulou, J.; Fletcher, J.M.; Bruno, D.L.; Goldblatt, J.; Dimasno, S.; Thorburn, D.R.; Mootha, V.K. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci. Transl. Med.*, 2012, 4(18), 118ra10.
- [32] Taylor, R.W.; Pyle, A.; Griffin, H.; Blakely, E.L.; Duff, J.; He, L.; Smetanko, T.; Alston, C.L.; Neeve, V.C.; Best, A.; Yaham, J.W.; Kirschner, J.; Sahara, U.; Talim, B.; Topaloglu, H.; Baric, I.; Holinski-Feder, E.; Ahicht, A.; Czermi, B.; Kleinle, S.; Morris, A.A.; Vassallo, G.; Gorman, G.S.; Ramesh, V.; Turnbull, D.M.; Santibanez-Koref, M.; McFarland, R.; Horvath, R.; Chinnery, P.F. Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA*, 2014, 312(1), 68-77.
- [33] Renkema, G.H.; Visser, G.; Baerding, F.; Wintjes, L.T.; Wolters, V.M.; van Montfrans, J.; de Kost, G.A.; Nikkels, P.G.; van Hasselt, P.M.; van der Crabben, S.N.; Rodenburg, R.J. Mutated PETF17 causes complex IV deficiency and is associated with neurodevelopmental regression and medulla oblongata lesions. *Hum. Genet.*, 2017, 136(6), 759-769.
- [34] Barel, O.; Christine V Maliodan, M.; Ben-Zeev, B.; Kandel, J.; Pri-Chen, H.; Stephen, J.; Castro, I.G.; Metz, J.; Atawa, O.; Moshkovitz, S.; Ganelin, E.; Barshack, I.; Polak-Charcon, S.; Nass, D.; Marek-Yagel, D.; Amariglio, N.; Shalva, N.; Vilboux, T.; Ferreira, C.; Podo-Shakled, B.; Heimer, G.; Hoffmann, C.; Yazdani, T.; Nissenkorn, A.; Avivi, C.; Eyal, E.; Kol, N.; Glick Saar, E.; Wallace, D.C.; Gahl, W.A.; Rechavi, G.; Schrader, M.; Eckmann, D.M.; Anikster, Y.; Anikster, Y. Deleterious variants in TRAK1 disrupt mitochondrial movement and cause fatal encephalopathy. *Brain*, 2017, 140(3), 568-581.
- [35] Shamseldin, H.E.; Smith, L.L.; Kentab, A.; Alkhalidi, H.; Summers, B.; Alshairi, H.; Xiong, Y.; Gupta, V.A.; Alluraya, F.S. Mutation of the mitochondrial carrier SLC25A42 causes a novel form of mitochondrial myopathy in humans. *Hum. Genet.*, 2016, 135(1), 21-30.
- [36] Nahorski, M.S.; Assi, M.; Wakeling, E.; Parker, A.; Assi, N.; Canham, N.; Holder, S.E.; Chen, Y.C.; Dyer, J.; Brady, A.F.; Takahashi, M.; Woods, C.G. CCDC88A mutations cause PEHO-like syndrome in humans and mouse. *Brain*, 2016, 139(Pt 4), 1036-1044.
- [37] Ouyang, Q.; Nakayama, T.; Baytas, O.; Davidson, S.M.; Yang, C.; Schmidt, M.; Lizarraga, S.B.; Mishra, S.; Eiquesny, M.; Niaz, S.; Gul But, M.; Inran Maraza, S.; Javel, A.; Chandry, H.R.; Vaughan, D.J.; Hill, R.S.; Parlow, J.N.; Yoo, S.Y.; Lam, A.T.; Nasir, R.; Al-Saffar, M.; Bankovich, A.J.; Schwede, M.; Nagpal, S.; Rajah, A.; DeBerardinis, R.J.; Housman, D.E.; Mochly, G.H.; Morrow, E.M. Mutations in mitochondrial enzyme GPT2 cause metabolic dysfunction and neurological disease with developmental and progressive features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, 113(38), E5598-E5607.
- [38] Bie, A.S.; Fernandez-Guerra, P.; Birkler, R.I.; Nisemblat, S.; Pelena, D.; Lu, X.; Deignan, J.L.; Lee, H.; Dorrani, N.; Corydon, T.J.; Palmfeldt, J.; Bivina, L.; Azem, A.; Herman, K.; Bross, P. Mutation in the HSP10 Gene encoding the mitochondrial co-chaperonin HSP10 and its potential association with a neurological and developmental disorder. *Front. Mol. Biosci. Front. Mol. Biosci.*, 2016, 3, 65.
- [39] Oláhová, M.; Thompson, K.; Hanly, S.A.; Barbosa, L.A.; Besse, A.; Anagnostou, M.E.; White, K.; Davey, T.; Simpson, M.A.; Champion, M.; Erns, G.; Schelley, S.; Lightowler, R.N.; Chrzanowska-Lightowler, Z.M.; McFarland, R.; Deshpande, C.; Bormen, P.E.; Taylor, R.W. Pathogenic variants in HTRA2 cause an early-onset mitochondrial syndrome associated with 3-methylglutaconic aciduria. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2017, 40(1), 121-130.
- [40] Holzerova, E.; Danhauser, K.; Haack, T.B.; Kremer, L.S.; Melcher, M.; Ingold, I.; Kobayashi, S.; Terrie, C.; Wolf, P.; Schaper, J.; Mayatepek, E.; Baerding, F.; Friedmann Angeli, J.P.; Conrad, M.; Strom, T.M.; Meitinger, T.; Prokisch, H.; Distelmaier, F. Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. *Brain*, 2016, 139(Pt 2), 346-354.
- [41] Metodiev, M.D.; Thompson, K.; Alston, C.L.; Morris, A.A.; He, L.; Anselmino, Z.; Rio, M.; Bahi-Buisson, N.; Pyle, A.; Griffin, H.; Sira, S.; Filipovska, A.; Munnich, A.; Chinnery, P.F.; McFarland, R.; Röig, A.; Taylor, R.W. Recessive mutations in TRMT10C cause defects in mitochondrial RNA processing and multiple respiratory chain deficiencies. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, 99(1), 246.
- [42] Eldomery, M.K.; Akdemir, Z.C.; Vogtle, F.N.; Chang, W.L.; Mulica, P.; Rosenfeld, J.A.; Gambin, T.; Gu, S.; Burrage, L.C.; Al Shamsi, A.; Penney, S.; Zhangjani, S.N.; Zimmerman, H.H.; Muzny, D.M.; Wang, X.; Tang, J.; Medikonda, R.; Ramachandran, P.V.; Wong, L.J.; Boerwinkle, E.; Gibbs, R.A.; Eng, C.M.; Lalani, S.R.; Herteaux, J.; Rodenburg, R.J.; Abdul-Rahman, O.A.; Yang, Y.; Xia, F.; Wang, M.C.; Lupski, J.R.; Meisinger, C.; Sutton, V.R. MPEP recessive variants cause a syndrome of left ventricular non-compaction, hypotonia, and infantile death. *Genome Med.*, 2016, 8(1), 106.
- [43] Kohda, M.; Tokuzawa, Y.; Kishita, Y.; Nyuzuki, H.; Moriyama, Y.; Mizuno, Y.; Hirata, T.; Yatsuka, Y.; Yamashita-Sugahara, Y.; Nakachi, Y.; Kato, H.; Okuda, A.; Tamaru, S.; Borna, N.N.; Banshoya, K.; Aigaki, T.; Sato-Miyata, Y.; Ohnuma, K.; Suzuki, T.; Nagao, A.; Maejima, H.; Matsuda, F.; Higasa, K.; Nagasaki, M.; Yasuda, J.; Yamamoto, M.; Fushimi, T.; Shimura, M.; Kaibo-Ichimoto, K.; Harashima, H.; Yamazaki, T.; Mori, M.; Murayama, K.; Ohtake, A.; Okazaki, Y. A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *PLoS Genet.*, 2016, 12(1), e1005679.
- [44] Pronicka, E.; Pietkiewicz-Abramczuk, D.; Ciara, E.; Trubicka, J.; Rokicka, D.; Karwicki-Więdkowska, A.; Pałajowska, M.; Jurkiewicz, E.; Halat, P.; Kosnińska, J.; Pollak,

- A.; Ryzdzanicz, M.; Stawinski, P.; Pronicki, M.; Knjewicka-Walasek, M.; Ploski, R. New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *J. Transl. Med.*, 2016, *14*(1), 174. doi: 10.1186/s12967-016-0930-9.
- [45] Legati, A.; Reyes, A.; Nasca, A.; Ivernizzi, F.; Lamantea, E.; Tiranti, V.; Garavaglia, B.; Lamperti, C.; Ardissona, A.; Moroni, I.; Robinson, A.; Ghezzi, D.; Zeviani, M. New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, *1857*(8), 1326-1335.
- [46] Phenome, E.; EuroEPINOMICS-RES Consortium; Epi4K Consortium. De novo mutations in synaptic transmission genes including DNMI cause epileptic encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.*, 2014, *95*(4), 360-370.
- [47] Madeo, M.; Stewart, M.; Sun, Y.; Sahir, N.; Wiethoff, S.; Chandrasekar, I.; Yarrow, A.; Rosenfeld, J.A.; Yang, Y.; Coleiro, D.; McCormick, E.M.; Muraresku, C.C.; Jepperson, T.N.; McBeth, L.J.; Seidahmed, M.Z.; El Khashab, H.Y.; Hamad, M.; Azzedine, H.; Clark, K.; Corrochano, S.; Wells, S.; Elting, M.W.; Weiss, M.M.; Bum, S.; Myers, A.; Landsverk, M.; Crowell, P.L.; Waisfisz, Q.; Wolf, N.I.; Nolan, P.M.; Pudilla-Lopez, S.; Houlihan, H.; Lifton, R.; Mane, S.; Singh, B.B.; Falk, M.J.; Mercimek-Mahmutoglu, S.; Bilguvar, K.; Salih, M.A.; Acevedo-Arozana, A.; Krueer, M.C. Acevedo-Arozana, A.; Krueer, M.C. Loss-of-function mutations in FRRS1L lead to an epileptic-dyskinetic encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, *98*(6), 1249-1255.
- [48] Han, C.; Alkhatir, R.; Froukh, T.; Minassian, A.G.; Galati, M.; Liu, R.H.; Fotouhi, M.; Sommerfeld, J.; Allrook, A.J.; Marshall, C.; Walker, S.; Bauer, P.; Scheuer, S.W.; Riess, O.; Buchert, R.; Minassian, B.A.; McPherson, P.S. Epileptic encephalopathy caused by mutations in the guanine nucleotide exchange factor DENND5A. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, *99*(6), 1359-1367.
- [49] Koch, J.; Mayr, J.A.; Alhaddad, B.; Rauscher, C.; Bierau, J.; Kovacs-Nagy, R.; Cone, K.L.; Bader, I.; Holzhaeker, M.; Prokisch, H.; Venzelar, H.; Wevers, R.A.; Distelmaier, F.; Polster, T.; Leiz, S.; Betzler, C.; Strom, T.M.; Sperl, W.; Meitinger, T.; Wotmann, S.B.; Haack, T.B. CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy. *Brain*, 2017, *140*(2), 279-286.
- [50] Aït-El-Mkadem, S.; Dayem-Quere, M.; Guic, M.; Chaussenot, A.; Bamwarth, S.; François, B.; Génin, E.C.; Fragaki, K.; Volter-Touw, C.L.; Vasmier, C.; Serre, V.; van Gassen, K.L.; Lespimasse, F.; Richter, S.; Eisenhofer, G.; Rouzier, C.; Mochel, F.; De Saint-Martin, A.; Abi Warde, M.T.; de Sain-van der Velde, M.G.; Jans, J.J.; Amiel, J.; Avsec, Z.; Mertes, C.; Haack, T.B.; Strom, T.; Meitinger, T.; Bonnen, P.E.; Taylor, R.W.; Gagneur, J.; van Hasselt, P.M.; Rößig, A.; Delahodde, A.; Prokisch, H.; Fuchs, S.A.; Paquis-Flucklinger, V. Mutations in MDH2, encoding a Krebs cycle enzyme, cause early-onset severe encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2017, *100*(1), 151-159.
- [51] Hardies, K.; Cai, Y.; Jardel, C.; Jansen, A.C.; Cao, M.; May, P.; Djémié, T.; Hachon Le Camus, C.; Keymolen, K.; Dexonnick, T.; Bhambhani, V.; Long, C.; Saján, S.A.; Helbig, K.L.; Suls, A.; Balling, R.; Helbig, I.; De Jonghe, P.; Depienne, C.; De Camilli, P.; Weckhuysen, S. Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain*, 2016, *139*(Pt 9), 2420-2430.
- [52] Assoum, M.; Philippe, C.; Inöber, B.; Perrin, L.; Makrythanas, P.; Sondheimer, N.; Paris, C.; Douglas, J.; Lesca, G.; Antonarakis, S.; Hamamy, H.; Jouan, T.; Duffourd, Y.; Auvin, S.; Samier, A.; Begtrup, A.; Nowak, C.; Chabron, N.; Ville, D.; Mireskandari, K.; Milani, P.; Jonveaux, P.; Lemer, G.; Milb, M.; Amamoto, M.; Kato, M.; Nakashima, M.; Miyake, N.; Matsumoto, N.; Maari, A.; Thauvin-Robinet, C.; Riviére, J.B.; Faivre, L.; Thevenon, J. Autosomal-recessive mutations in AP3B2 adaptor-related protein complex 3 beta 2 subunit, cause an early-onset epileptic encephalopathy with optic atrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, *99*(6), 1368-1376.
- [53] Sikienska, A.; Irie, M.; Liu, Y.; Scheldeman, C.; Vanthillo, N.; Lagae, L.; de Witte, P.A.; Van Esch, H.; Goldfarb, M.; Buyse, G.M. Gain-of-function FHF1 mutation causes early-onset epileptic encephalopathy with cerebellar atrophy. *Neurology*, 2016, *86*(23), 2162-2170.
- [54] Li, D.; Yuan, H.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Marsh, E.D.; Tian, L.; McCormick, E.M.; Kosobucki, G.; Chen, W.; Schuller, A.J.; Chivacci, R.; Tankovic, A.; Nasse, C.; Bruckner, F.; von Stühlhagen-Steinbeis, C.; Hu, C.; Kusumoto, H.; Hedrich, U.B.; Elson, G.; Hörnagel, K.; Aizenman, E.; Lemke, J.R.; Hakonarson, H.; Traynelis, S.F.; Falk, M.J. GRIN2D recurrent de novo dominant mutation causes a severe epileptic encephalopathy treatable with NMDA receptor channel blockers. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, *99*(4), 802-816.
- [55] Muona, M.; Ishimura, R.; Laani, A.; Ichimura, Y.; Linnankivi, T.; Keski-Filppula, R.; Hervä, R.; Rantala, H.; Paetani, A.; Pöyhönen, M.; Ohtani, M.; Uemura, T.; Karhu, T.; Bizzi, N.; Takebayashi, H.; McKee, S.; Parker, M.J.; Akawi, N.; McRae, J.; Hultes, M.E.; Stady, D.D. Kusimien, O.; Kurki, M.I.; Anttonen, A.K.; Tanaka, K.; Palotie, A.; Wagaré, S.; Lehesjoki, A.E.; Komatsu, M. Biallelic variants in UBA1 link dysfunctional UFM ubiquitin-like modifier pathway to severe infantile-onset encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, *99*(3), 683-694.
- [56] Epi, K. Consortium. De novo mutations in SLC1A2 and CACNA1A are important causes of epileptic encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.*, 2016, *99*(2), 287-298.
- [57] Alfáiz, A.A.; Müller, V.; Boutry-Kryza, N.; Ville, D.; Gues, N.; de Bellecize, J.; Rivier, C.; Labahme, A.; des Portes, V.; Edey, P.; Till, M.; Xenarios, I.; Sanlaville, D.; Herrmann, J.M.; Lesca, G.; Raymond, A. West syndrome caused by homozygous variant in the evolutionary conserved gene encoding the mitochondrial elongation factor GUF1. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2016, *24*(7), 1001-1008.
- [58] Allen, N.M.; Corroy, J.; Shahwan, A.; Lynch, B.; Correa, R.G.; Pena, S.D.; McCreary, D.; Magalhães, T.R.; Ennis, S.; Lynch, S.A.; King, M.D. Atypical benign partial epilepsy of childhood with acquired neurocognitive, lexical semantic, and autistic spectrum disorder. *Epilepsy Behav. Case Rep.*, 2016, *6*, 42-8.
- [59] Allen, A.S.; Berkovic, S.F.; Cossette, P.; Delanty, N.; Dlugos, D.; Eichler, E.E.; Epstein, M.P.; Glauser, T.; Goldstein, D.B.; Han, Y.; Heinzen, E.L.; Howell, K.B.; Johnson, M.R.; Kuzniecky, R.; Lowenstein, D.H.; Lu, Y.F.; Madou, M.R.; Marson, A.G.; Heinzen, E.L.; Mefford, H.C.; Esmaeili Nieh, S.; O'Brien, T.J.; Ottman, R.; Petrovski, S.; Poduri, A.; Ruzzo, E.K.; Scheffer, I.E.; Sherr, E.H.; Yuskaitis, C.J.; Abou-Khalil, B.; Alkredge, B.K.; Baraita, J.F.; Benkovik, S.F.; Boro, A.; Cascino, G.D.; Consolino, D.; Cramerine, P.; Devinsky, O.; Dlugos, D.; Epstein, M.P.; Fiol, M.; Fountain, N.B.; French, J.; Friedman, D.; Geller, E.B.; Glauser, T.; Glynn, S.; Haut, S.R.; Hayward, J.; Helmers, S.L.; Joshi, S.; Kanner, A.; Kirisch, H.E.; Knowlton, R.C.; Kossoff, E.H.; Kupeman, R.; Kuzniecky, R.; Lowenstein, D.H.; McGuire, S.M.; Motika, P.V.; No-

- vomy, E.J.; Ottman, R.; Paolicihi, J.M.; Parent, J.M.; Park, K.; Poduri, A.; Scheffer, I.E.; Shelhaas, R.A.; Sherr, E.H.; Shih, J.J.; Singh, R.; Sirven, J.; Smith, M.C.; Sullivan, J.; Lin Thio, L.; Venkat, A.; Vining, E.P.; Von Allmen, G.K.; Weisenberg, J.L.; Widdess-Walsh, P.; Winawer, M.R. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*, **2013**, *501*(7466), 217-221.
- [60] McTague, A.; Howell, K.B.; Cross, J.H.; Kurian, M.A.; Scheffer, I.E. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*, **2016**, *15*(3), 304-316.
- [61] Vissers, L.E.; de Lig, J.; Gillissen, C.; Janssen, I.; Stehouwer, M.; de Vries, P.; van Lier, B.; Arts, P.; Wieskamp, N.; del Rosario, M.; van Bon, B.W.; Hoischen, A.; de Vries, B.B.; Brunner, H.G.; Veltman, J.A. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet*, **2010**, *42*(12), 1109-1112.
- [62] de Lig, J.; Willemsen, M.H.; van Bon, B.W.; Kleefstra, T.; Yntema, H.G.; Kros, T.; Vulto-van Silfhout, A.T.; Koolen, D.A.; de Vries, P.; Gillissen, C.; del Rosario, M.; Hoischen, A.; Scheffer, H.; de Vries, B.B.; Brunner, H.G.; Veltman, J.A.; Vissers, L.E. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.*, **2012**, *367*(20), 1921-1929.
- [63] Harripaul, R.; Vaidi, N.; Mikhailov, A.; Rafiq, M.A.; Mittal, K.; Windpassinger, C.; Sheikh, T.J.; Noor, A.; Mahmood, H.; Downey, S.; Johnson, M.; Vlaicu, K.; Bell, L.; Ilyas, M.; Khan, F.S.; Khan, V.; Moradi, M.; Ayaz, M.; Naeem, F.; Heikari, A.; Ahmed, I.; Ghadami, S.; Agha, Z.; Zeinali, S.; Qamar, R.; Mozhdehpanah, H.; John, P.; Mir, A.; Ansar, M.; French, L.; Ayub, M.; Vincent, J.B. Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Mol Psychiatry*, **2017**. Doi: 10.1038/mp.2017.60.
- [64] O'Roak, B.J.; Derizis, P.; Lee, C.; Vives, L.; Schwartz, J.J.; Girirajan, S.; Karakoc, E.; Mackenzie, A.P.; Ng, S.B.; Baker, C.; Rieder, M.J.; Nickerson, D.A.; Bernier, R.; Fisher, S.E.; Shendure, J.; Eichler, E.E. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet*, **2011**, *43*(6), 585-589.
- [65] Jiang, Y.H.; Yuen, R.K.; Jin, X.; Wang, M.; Chen, N.; Wu, X.; Ju, J.; Mei, J.; Shi, Y.; He, M.; Wang, G.; Liang, J.; Wang, Z.; Cao, D.; Carter, M.T.; Chrysler, C.; Dmic, I.E.; Howe, J.L.; Lau, L.; Marshall, C.R.; Merico, D.; Nalpathakulam, T.; Thiruvahindrapuram, B.; Thompson, A.; Udin, M.; Walker, S.; Luo, J.; Anagnostou, E.; Zwaigenbaum, L.; Ring, R.H.; Wang, J.; Lajonchere, C.; Wang, J.; Shih, A.; Szatmari, P.; Yang, H.; Dawson, G.; Li, Y.; Scherer, S.W. Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am. J. Hum. Genet.*, **2013**, *93*(2), 249-263.
- [66] O'Roak, B.J.; Stessman, H.A.; Boyle, E.A.; Witherspoon, K.T.; Martin, B.; Lee, C.; Vives, L.; Baker, C.; Hiatt, J.B.; Nickerson, D.A.; Bernier, R.; Shendure, J.; Eichler, E.E. Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat Commun.*, **2014**, *5*, 5595.
- [67] Sanders, S.J.; Murtha, M.T.; Gupta, A.R.; Murdoch, J.D.; Raubeson, M.J.; Wilsey, A.J.; Ercan-Sencicek, A.G.; DiLullo, N.M.; Pankshak, N.N.; Stein, J.L.; Walker, M.F.; Ober, G.T.; Teran, N.A.; Song, Y.; El-Fishawy, P.; Murtha, R.C.; Choi, M.; Overton, J.D.; Bjornson, R.D.; Carriero, N.J.; Meyer, K.A.; Bilguvar, K.; Mane, S.M.; Sestan, N.; Lifton, R.P.; Guelel, M.; Roeder, K.; Geschwind, D.H.; Devlin, B.; State, M.W. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, **2012**, *485*(7397), 237-241.
- [68] Neale, B.M.; Kou, Y.; Liu, L.; Ma'ayan, A.; Samocha, K.E.; Sabo, A.; Lin, C.F.; Stevens, C.; Wang, L.S.; Makarov, V.; Polak, P.; Yoon, S.; Maguire, J.; Crawford, E.L.; Campbell, N.G.; Geller, E.T.; Valladares, O.; Schaffer, C.; Liu, H.; Zhao, T.; Cai, G.; Limb, J.; Dammenfelser, R.; Jabado, O.; Peralta, Z.; Nagaswamy, U.; Muzny, D.; Reid, J.G.; Newsham, I.; Wu, Y.; Lewis, L.; Han, Y.; Voight, B.F.; Lim, E.; Rossin, E.; Kirby, A.; Flannick, J.; Fromer, M.; Shadrir, K.; Fennell, T.; Garmella, K.; Banks, E.; Poplin, R.; Gabriel, S.; DePristo, M.; Wimbush, J.R.; Boone, B.E.; Levy, S.E.; Betancur, C.; Suryav, S.; Boerwinkle, E.; Bushbaum, J.D.; Cook, E.H., Jr.; Devlin, B.; Gibbs, R.A.; Roeder, K.; Schellenberg, G.D.; Sutcliffe, J.S.; Daly, M.J. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, **2012**, *485*(7397), 242-245.
- [69] Iossifov, I.; Ronemus, M.; Levy, D.; Wang, Z.; Hakker, I.; Rosenbaum, J.; Yamrom, B.; Lee, Y.H.; Narzisi, G.; Leotta, A.; Kendall, J.; Grabowska, E.; Ma, B.; Marks, S.; Rodgers, L.; Stepansky, A.; Troge, J.; Andrews, P.; Belkirk, M.; Pradhan, K.; Ghiban, E.; Kramer, M.; Parla, J.; Demeter, R.; Fulton, L.L.; Fulton, R.S.; Magrini, V.J.; Ye, K.; Darnell, J.C.; Darnell, R.B.; Matis, E.R.; Wilson, R.K.; Schatz, M.C.; McCombie, W.R.; Wigler, M. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*, **2012**, *74*(2), 285-299.
- [70] Butler, M.G.; Rafi, S.K.; Hossain, W.; Stephan, D.A.; Manzardo, A.M. Whole exome sequencing in females with autism implicates novel and candidate genes. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*(1), 1312-1335.
- [71] O'Roak, B.J.; Vives, L.; Girirajan, S.; Karakoc, E.; Krumm, N.; Coe, B.P.; Levy, R.; Ko, A.; Lee, C.; Smith, J.D.; Turner, E.H.; Stanaway, I.B.; Vernot, B.; Maig, M.; Baker, C.; Reilly, B.; Akey, J.M.; Borenstein, E.; Rieder, M.J.; Nickerson, D.A.; Bernier, R.; Shendure, J.; Eichler, E.E. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, **2012**, *485*(7397), 246-250.
- [72] Reiner, O.; Karzhun, E.; Kshirsagar, A.; Kaibuchi, K. Regulation of neuronal migration, an emerging topic in autism spectrum disorders. *J. Neurochem.*, **2016**, *136*(3), 440-456.
- [73] Alrayes, N.; Mohamoud, H.S.; Ahmed, S.; Almrarhi, M.M.; Shuaib, T.M.; Wang, J.; Al-Aama, J.Y.; Everett, K.; Nasir, J.; Jelani, M. The alkylglycerol monooxygenase (AGMO) gene previously involved in autism also causes a novel syndromic form of primary microcephaly in a consanguineous Saudi family. *J. Neurol. Sci.*, **2016**, *363*, 240-244.
- [74] Rivière, J.B.; Mirza, G.M.; O'Roak, B.J.; Beddoui, M.; Alcantara, D.; Comway, R.L.; So-Ong, J.; Schwartzentruber, J.A.; Gripp, K.W.; Nikkel, S.M.; Worthylake, T.; Sullivan, C.T.; Ward, T.R.; Butler, H.E.; Kramer, N.A.; Albrecht, B.; Armour, C.M.; Armstrong, L.; Caluserio, O.; Cytzybaum, C.; Drolet, B.A.; Innes, A.M.; Lauzon, J.L.; Lin, A.E.; Mancini, G.M.; Meschino, W.S.; Reggin, J.D.; Saggat, A.K.; Lerman-Sagie, T.; Uyanik, G.; Weltsberg, R.; Zim, B.; Benuliu, C.L.; Majewski, J.; Bulman, D.E.; O'Driscoll, M.; Shendure, J.; Graham, J.M., Jr; Boycott, K.M.; Dobyns, W.B. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*, **2012**, *44*(8), 934-940.

- [75] Lee, J.H.; Huynh, M.; Silhavy, J.L.; Kim, S.; Dixon-Salazar, T.; Heiberg, A.; Scott, E.; Bafna, V.; Hui, K.J.; Collazo, A.; Fuzari, V.; Russ, C.; Gabriel, S.B.; Mathern, G.W.; Gleason, J.G. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat. Genet.* 2012, 44(8), 941-945.
- [76] Wan, J.; Youssouf, M.; Mamas, H.; Rudnik-Schöneborn, S.; Meneses, M.P.; Hong, J.E.; Leong, D.W.; Senderek, J.; Salman, M.S.; Chintay, C.; Seeman, P.; von Moers, A.; Gmsl-Neumann, L.; Kornberg, A.J.; Castro-Gago, M.; Sobrido, M.J.; Sanefuji, M.; Shieh, P.B.; Salamon, N.; Kim, R.C.; Vinters, H.V.; Chen, Z.; Zerres, K.; Ryan, M.M.; Nelson, S.F.; Jen, J.C. Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 2012, 44(6), 704-708.
- [77] Poirier, K.; Lebrun, N.; Broix, L.; Tian, G.; Saillour, Y.; Boscheron, C.; Parrini, E.; Valence, S.; Pierre, B.S.; Oger, M.; Lacombe, D.; Geneviève, D.; Fontana, E.; Darra, F.; Cancos, C.; Barth, M.; Bonneau, D.; Bernardina, B.D.; Nguyen, S.; Griaux, C.; Parent, P.; des Portes, V.; Pedespan, J.M.; Legrez, V.; Castelnaud-Pétrine, L.; Nitschke, P.; Hies, T.; Masson, C.; Zelenika, D.; Andrieux, A.; Francis, F.; Guernin, R.; Cowan, N.J.; Bahi-Buisson, N.; Chelly, J. Mutations in TUBG1, DYX1C1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* 2013, 45(6), 639-647.
- [78] Sim, J.C.; Scerri, T.; Fanjul-Fernández, M.; Rieley, J.R.; Gillies, G.; Pope, K.; van Roozendaal, H.; Heng, J.L.; Mandelstam, S.A.; McGillivray, G.; MacGregor, D.; Kannan, L.; Maixner, W.; Harvey, A.S.; Amor, D.J.; Delatycki, M.B.; Crino, P.B.; Bahlo, M.; Lockhart, P.J.; Leventer, R.J. Familial cortical dysplasia caused by mutation in the mTOR regulator NPRL3. *Ann. Neurol.* 2015, 79(1), 132-137.
- [79] Ann, A.; Rosenfeld, N.; Jamn, R.; Renbaum, P.; Zuckerman, S.; Fridman, H.; Zeligson, S.; Segel, R.; Kohn, Y.; Kamal, L.; Kanaan, M.; Segov, Y.; Mazaki, E.; Rabinowitz, R.; Shen, O.; Lee, M.; Walsh, T.; King, M.C.; Gulsamer, S.; Levy-Lahad, E. Loss of function of PCDH12 underlies recessive microcephaly mimicking intrauterine infection. *Neurology* 2016, 86(21), 2016-2024.
- [80] Breuss, M.W.; Sultan, T.; James, K.N.; Rossi, R.O.; Scott, E.; Musayev, D.; Furia, B.; Reis, A.; Sücht, H.; Al-Owain, M.; Alkuraya, F.S.; Reuter, M.S.; Abou Jamra, R.; Trotta, C.R.; Gleason, J.G. Autosomal-Recessive Mutations in the tRNA Splicing Endonuclease Subunit TSEN15 Cause Pontocerebellar Hypoplasia and Progressive Microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 2016, 99(1), 228-235.
- [81] Zillhardt, J.L.; Poirier, K.; Broix, L.; Lebrun, N.; Elmorjani, A.; Martinovic, J.; Saillour, Y.; Muraca, G.; Nectoux, J.; Besieres, B.; Fallet-Bianco, C.; Lyonnet, S.; Dulac, O.; Odent, S.; Rejeb, I.; Ben Jemaa, L.; Rivier, F.; Pinson, L.; Geneviève, D.; Musizzano, Y.; Bigi, N.; Leboucq, N.; Giuliano, F.; Philip, N.; Vilain, C.; Van Gaogaert, P.; Maurey, H.; Beldjord, C.; Ariguenave, F.; Boland, A.; Olaso, R.; Masson, C.; Nitschke, P.; Deleuze, J.F.; Bahi-Buisson, N.; Chelly, J. Mosaic parental germline mutations causing recurrent forms of malformations of cortical development. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016, 24(4), 611-614.
- [82] Xu, B.; Roos, J.L.; Dexheimer, P.; Boone, B.; Plummer, B.; Levy, S.; Gogos, J.A.; Karayiorgos, M. Exome sequencing supports a de novo mutational paradigm for schizophrenia. *Nat. Genet.* 2011, 43(9), 864-868.
- [83] Wen, Z.; Cheng, T.L.; Yin, D.Z.; Sun, S.B.; Wang, Z.; Yu, S.Y.; Zhang, Y.; Qiu, Z.; Du, Y.S. Identification of the genetic cause for childhood disintegrative disorder by whole exome sequencing. *Neurosci. Bull.* 2017, 33(2), 251-254.
- [84] Snaedmark-Margules, N.; Brownstein, C.A.; Vargas, S.; Tembulkar, S.K.; Towne, M.C.; Shi, J.; Gonzalez-Cuevas, E.; Liu, K.X.; Bilgivar, K.; Kleiman, R.J.; Han, M.J.; Torres, A.; Bery, G.T.; Yu, T.W.; Beggs, A.H.; Agrawal, P.B.; Gonzalez-Heydrich, J. A novel de novo mutation in ATP1A3 and childhood-onset schizophrenia. *Cold Spring Harb. Mol. Cell. Biol.* 2016, 3(5), a010008.
- [85] Lescai, F.; Ak, T.D.; Li, Q.; Nyegaard, M.; Andersdotir, G.; Biskopstun, M.; Hedemand, A.; Fiorentino, A.; O'Brien, N.; Jarram, A.; Liang, J.; Grove, J.; Pallesen, J.; Eickhardt, E.; Mattheisen, M.; Boland, L.; Demontis, D.; Wang, A.G.; McQuillin, A.; Mors, O.; Wang, J.; Bergum, A.D. Whole-exome sequencing of individuals from an isolated population implicates rare risk variants in bipolar disorder. *Transl. Psychiatry* 2017, 7(2), e1034.
- [86] Girard, S.L.; Gauthier, J.; Norou, A.; Xiong, L.; Zhou, S.; Jouan, L.; Diome-Laporte, A.; Spiegelman, D.; Henrion, E.; Diallo, O.; Thibodeau, P.; Bachand, I.; Bao, J.Y.; Tong, A.H.; Lin, C.H.; Millet, B.; Jaafari, N.; Joobar, R.; Dion, P.A.; Lok, S.; Krebs, M.O.; Rouleau, G.A. Increased exomic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nat. Genet.* 2011, 43(9), 860-863.
- [87] Chardon, J.W.; Smith, A.C.; Wolfe, J.; Pena, E.; Rakhra, K.; Demie, C.; Beaulieu, C.; Huang, L.; Schwartzentruber, J.; Hawkins, C.; Harms, M.B.; Dojeji, S.; Zhang, M.; Majewski, J.; Bulman, D.E.; Boycott, K.M.; Dymert, D.A. LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. *Clin. Genet.* 2015, 88(6), 558-564.
- [88] Schindler, R.F.; Souton, C.; Zhang, J.; Passarelli, C.; Ortiz-Bonnin, B.; Simrick, S.; Schwerte, T.; Poon, K.L.; Fang, M.; Rimmé, S.; Proese, A.; Nikolaev, V.O.; Grunert, C.; Müller, T.; Tascia, G.; Sarathchandra, P.; Drago, F.; Dalpiccola, B.; Rapezzi, C.; Arbustini, E.; Di Raimo, F.R.; Neri, M.; Selvatici, R.; Gualandri, F.; Fattori, F.; Pietrangeli, A.; Li, W.; Jiang, H.; Xu, X.; Bettini, E.; Decher, N.; Wang, J.; Brand, T.; Ferlini, A. POPDC1(S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. *J. Clin. Invest.* 2016, 126(1), 239-253.
- [89] Kayman-Kurecki, G.; Talim, B.; Korkusuz, P.; Sayar, N.; Satioglu, T.; Oncel, I.; Sharafi, P.; Gundesh, H.; Balci-Hayta, B.; Purali, N.; Serdaroglu-Ofazer, P.; Topaloglu, H.; Dincer, P. Mutation in TOR1AIP1 encoding LAP1B in a form of muscular dystrophy: a novel gene related to nuclear envelopeopathies. *Neuromuscul. Disord.* 2014, 24(7), 624-633.
- [90] Basmanav, F.B.; Opriscoeanu, A.M.; Pastermack, S.M.; Thiele, H.; Fritz, G.; Wenzel, J.; Gröber, L.; Welner, M.; Wolf, S.; Fagenberg, C.; Bygum, A.; Altmüller, J.; Rütten, A.; Parmentier, L.; El Shabrawi-Caelen, L.; Hafner, C.; Nürnberg, P.; Kruse, R.; Schoch, S.; Hanneken, S.; Betz, R.C. Mutations in POGGLUT1, encoding protein O-glucosyltransferase 1, cause autosomal-dominant Dowling-Degos disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2014, 94(1), 135-143.
- [91] Strausberg, R.; Schottmann, G.; Saddy, M.; Gill, E.; Seifert, F.; Haley, A.; Qassem, K.; Rendu, J.; van der Ven, P.F.; Stenzel, W.; Schuelke, M. Kyphoscoliosis pectus excavata (KY) mutation causes a novel congenital myopathy with core targetoid defects. *Acta Neuropathol.* 2016, 132(3), 475-478.
- [92] O'Grady, G.L.; Best, H.A.; Szal, T.E.; Schartner, V.; Sanjuan-Vazquez, M.; Donkersvoort, S.; Abadi Neto, O.; Sutton, R.B.; Ilkovič, B.; Romero, N.B.; Stojkovic, T.; Dastgir, J.; Waddell, L.B.; Boland, A.; Hu, Y.; Williams, C.

- Ruparelis, A.A.; Maisonobe, T.; Peduto, A.J.; Reddel, S.W.; Lek, M.; Tukiainen, T.; Cummings, B.B.; Joshi, H.; Nectoux, J.; Brammah, S.; Deleuze, J.F.; Ing, V.O.; Ramm, G.; Ardic, D.; Nowak, K.J.; Talim, B.; Topaloglu, H.; Laing, N.G.; North, K.N.; MacArthur, D.G.; Friant, S.; Clarke, N.F.; Bryson-Richardson, R.J.; Bönnemann, C.G.; Laporte, J.; Cooper, S.T. Variants in the oxidoreductase PYROXD1 cause early-onset myopathy with internalized nuclei and myofibrillar disorganization. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *99*(5), 1086-1105.
- [93] Majczenko, K.; Davidson, A.E.; Camelo-Piragua, S.; Agrawal, P.B.; Manfreedy, R.A.; Li, X.; Joshi, S.; Xu, J.; Peng, W.; Beggs, A.H.; Li, J.Z.; Burneister, M.; Dowling, J.J. Dominant mutation of CCDC78 in a unique congenital myopathy with prominent internal nuclei and atypical cores. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *91*(2), 365-371.
- [94] Agrawal, P.B.; Pierson, C.R.; Joshi, M.; Liu, X.; Ravenscroft, G.; Moghadamzadeh, B.; Talabere, T.; Viola, M.; Swanson, L.C.; Halioglu, G.; Talim, B.; Yau, K.S.; Allcock, R.J.; Laing, N.G.; Perrella, M.A.; Beggs, A.H. SPEEG interacts with myotubularin, and its deficiency causes centromeric myopathy with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2014**, *95*(2), 218-226.
- [95] Cosins, J.; Belaya, K.; Hicks, D.; Salih, M.A.; Finlayson, S.; Carboni, N.; Liu, W.W.; Maxwell, S.; Zoltowska, K.; Farsani, G.T.; Laval, S.; Seidhamed, M.Z.; Dornmely, P.; Bentley, D.; McGowan, S.J.; Müller, J.; Palace, J.; Lochmüller, H.; Beeson, D. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain* **2013**, *136*(Pt 3), 944-956.
- [96] O'Connor, E.; Töpf, A.; Müller, J.S.; Cox, D.; Evangelista, T.; Colomer, J.; Abicht, A.; Senderek, J.; Hasselmann, O.; Yramis, A.; Laval, S.H.; Lochmüller, H. Identification of mutations in the MYO9A gene in patients with congenital myasthenic syndrome. *Brain* **2016**, *139*(Pt 8), 2143-2153.
- [97] Kambouris, M.; Thevenon, J.; Soldatos, A.; Cox, A.; Stephen, J.; Ben-Omran, T.; Al-Sarraj, Y.; Boulos, H.; Bone, W.; Mullikin, J.C.; Masour-Paulet, A.; St-Onge, J.; Dufford, Y.; Chantegret, C.; Thuvin-Robinet, C.; Al-Alami, J.; Faivre, L.; Riviere, J.B.; Gahl, W.A.; Bassuk, A.G.; Malicdan, M.C.; El-Shanti, H. Biallelic SCN0A mutations in neuromuscular disease and epileptic encephalopathy. *AR Am Clin Transl Neurol* **2016**, *4*(1), 26-35.
- [98] Tétrault, M.; Gonzalez, M.; Dicaire, M.J.; Allard, P.; Gehring, K.; Leblanc, D.; Ledere, N.; Schondorf, R.; Mathieu, J.; Zuchner, S.; Biais, B. Adult-onset painful axonal polyneuropathy caused by a dominant NAGLU mutation. *Brain* **2015**, *138*(Pt 6), 1477-1483.
- [99] Hong, Y.B.; Kang, J.; Kim, J.H.; Lee, J.; Kwak, G.; Hyun, Y.S.; Nam, S.H.; Hong, H.D.; Choi, Y.R.; Jung, S.C.; Koo, H.; Lee, J.E.; Choi, B.O.; Chung, K.W. DGAT2 Mutation in a Family with Autosomal-Dominant Early-Onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*(5), 473-480.
- [100] Sevilla, T.; Lupo, V.; Martínez-Rubio, D.; Sancho, P.; Siverra, R.; Chumillas, M.J.; García-Romero, M.; Pascual-Pascual, S.I.; Muelas, N.; Dopazo, J.; Vilchez, J.J.; Palau, F.; Espinós, C. Mutations in the MORC2 gene cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* **2016**, *139*(Pt 1), 62-72.
- [101] Safka Bruzkova, D.; Deconinck, T.; Griffin, L.B.; Ferbert, A.; Haberova, J.; Mazanc, R.; Lassuthova, P.; Roth, C.; Pihanankul, T.; Rautenstrauss, B.; Janocka, A.R.; Zavadakova, P.; Christ, R.; Rivolta, C.; Zuchner, S.; Antonelli, A.; Beg, A.A.; De Jonghe, P.; Senderek, J.; Seeman, P.; Baets, I. Loss of function mutations in HARS cause a spectrum of inherited peripheral neuropathies. *Brain* **2015**, *138*(Pt 8), 2161-2172.
- [102] Novarino, G.; Fenstermaker, A.G.; Zaki, M.S.; Hofree, M.; Silhavy, J.L.; Heiberg, A.D.; Abdellatef, M.; Rosti, B.; Scott, E.; Mansour, L.; Masri, A.; Kayserili, H.; Al-Aama, J.Y.; Abdel-Salam, G.M.; Karminejad, A.; Kara, M.; Kara, B.; Bozorgmehr, B.; Ben-Omran, T.; Mojahedi, F.; El Din Mahmoud, I.G.; Bouslam, N.; Boubouche, A.; Benomar, A.; Hanein, S.; Raymond, L.; Forlani, S.; Mascaro, M.; Selim, I.; Shehata, N.; Al-Allawi, N.; Bindu, P.S.; Azam, M.; Gmel, M.; Caglayan, A.; Bilguvar, K.; Tolun, A.; Issa, M.Y.; Schroth, J.; Spencer, E.G.; Rosti, R.O.; Aktuz, N.; Vaux, K.K.; Johansen, A.; Koh, A.A.; Megahed, H.; Durr, A.; Brice, A.; Stevanin, G.; Gabriel, S.B.; Ideler, T.; Gleason, J.G. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* **2014**, *343*(6170), 506-511.
- [103] Gudly, C.; Zhu, P.P.; Leonardis, L.; Papić, L.; Zidar, J.; Schabhtül, M.; Strohmaier, H.; Weis, J.; Strom, T.M.; Baets, J.; Willems, J.; De Jonghe, P.; Reilly, M.M.; Föhlisch, E.; Hatz, M.; Trajanczyk, S.; Pieber, T.R.; Janecke, A.R.; Blackstone, C.; Auer-Grumbach, M. Targeted high-throughput sequencing identifies mutations in atlastin-1 as a cause of hereditary sensory neuropathy type I. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88*(1), 99-105.
- [104] Klein, C.J.; Botbyan, M.V.; Wu, Y.; Ward, C.J.; Nicholson, G.A.; Hammans, S.; Hojo, K.; Yamamishi, H.; Karpf, A.R.; Wallace, D.C.; Simon, M.; Lander, C.; Boardman, L.A.; Cunningham, J.M.; Smith, G.E.; Litchy, W.J.; Boes, R.; Atkinson, E.J.; Middha, S.; B Dyck, P.J.; Parisi, J.E.; Mer, G.; Smith, D.L.; Dyck, P.J. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat. Genet.* **2011**, *43*(6), 595-600.
- [105] Komak, U.; Mademan, I.; Schinke, M.; Voigt, M.; Krawitz, P.; Hecht, J.; Barvencik, F.; Schinke, T.; Gieselmann, S.; Beil, F.T.; Poo-Serradell, A.; Vilchez, J.J.; Beetz, C.; Deconinck, T.; Timmerman, V.; Kaether, C.; De Jonghe, P.; Hübner, C.A.; Gal, A.; Amling, M.; Mundlos, S.; Baets, J.; Kuth, I. Sensory neuropathy with bone destruction due to a mutation in the membrane-shaping atlastin GTPase 3. *Brain* **2014**, *137*(Pt 3), 683-692.
- [106] Ahmed, M.Y.; Al-Khayat, A.; Al-Munhedi, F.; Al-Futaisi, A.; Chiom, B.A.; Pedro Fernandez-Murray, J.; Sef, J.E.; Salter, C.G.; Harilal, G.V.; Rawlins, L.E.; Al-Zahabi, S.; Al-Azri, F.; Al-Rashdi, F.; Cazenave-Gassiot, A.; Wenk, M.R.; Al-Salmi, F.; Patton, M.A.; Silver, D.L.; Baple, E.L.; McMaster, C.R.; Crosby, A.H. A mutation of EPT1 (SELEN1) underlies a new disorder of Kennedy pathway phospholipid biosynthesis. *Brain* **2017**, *140*(3), 547-554.
- [107] Helbig, B.L.; Mroske, C.; Moorthy, D.; Saján, S.A.; Velinov, M. Biallelic loss-of-function variants in DOCK3 cause muscle hypotonia, ataxia, and intellectual disability. *Clin. Genet.* **2017**, *92*(4), 430-433.
- [108] Guzmán, Y.F.; Ramsey, K.; Stolz, J.R.; Craig, D.W.; Huettelmann, M.J.; Narayanan, V.; Swanson, G.T. A gain-of-function mutation in the GRK2 gene causes neurodevelopmental deficits. *NeuroGenet* **2017**, *3*(1), e129.
- [109] Perez, Y.; Shore, Z.; Liami-Leibson, K.; Chabossou, P.; Kadir, R.; Volodarsky, M.; Halperin, D.; Barber-Zucker, S.; Shalev, H.; Schreiber, R.; Gradstein, L.; Ourevich, E.; Zariwch, R.; Rutter, G.A.; Landau, D.; Birk, O.S. SLC30A9 mutation affecting intracellular zinc homeostasis causes a novel cerebro-renal syndrome. *Brain* **2017**, *140*(4), 928-939.

- [110] Wiedhoff, S.; Bettencourt, C.; Pundel, R.; Madon, P.; Liu, Y.T.; Hersheson, J.; Wadia, N.; Desai, J.; Houlden, H. Pure cerebellar ataxia with homozygous mutations in the PNPLA6 Gene. *Cerebellum*, 2017, 17(1), 262-267.
- [111] Lee, J.Y.; Hsu, C.K.; Michael, M.; Nanda, A.; Liu, L.; McMillan, J.R.; Pourroyron, C.; Takeichi, T.; Tolar, J.; Reid, E.; Hayday, T.; Blumen, S.C.; Abu-Mouch, S.; Stausberg, R.; Basel-Varagute, L.; Barham, Y.; Zouabi, Y.; Al-Ajmi, H.; Huang, H.Y.; Lin, T.C.; Akiyama, M.; Lee, J.Y.; McLean, W.H.; Simpson, M.A.; Parsons, M.; McGraff, J.A. Large intragenic deletion in DSTYK underlies autosomal-recessive complicated spastic paraparesis, SPG23. *Am. J. Hum. Genet.*, 2017, 100(2), 364-370.
- [112] Elsaid, M.F.; Chalchoub, N.; Ben-Omran, T.; Kumar, P.; Kamel, H.; Ibrahīm, K.; Mohamoud, Y.; Al-Dous, E.; Al-Azwani, I.; Malek, J.A.; Suhr, K.; Ross, M.E.; Aleem, A.A. Mutation in noncoding RNA RNUI2 causes early-onset cerebellar ataxia. *Ann. Neurol.*, 2017, 81(1), 68-78.
- [113] Wang, J.L.; Yang, X.; Xia, K.; Hu, Z.M.; Weng, L.; Jin, X.; Jiang, H.; Zhang, P.; Shen, L.; Guo, J.F.; Li, N.; Li, Y.R.; Lei, L.F.; Zhou, J.; Du, J.; Zhou, Y.F.; Pan, Q.; Wang, J.; Wang, J.; Li, R.Q.; Tang, B.S. TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain*, 2010, 133(Pt 12), 3510-3518.
- [114] Guerguicheva, V.; Azmanov, D.N.; Angelicheva, D.; Smith, K.R.; Chamova, T.; Florez, L.; Bynevelt, M.; Nguyen, T.; Cherninkova, S.; Bojinova, V.; Kaprolyan, A.; Angelova, L.; Morar, B.; Chandler, D.; Kaneva, R.; Bahlo, M.; Tournev, I.; Kalaydjieva, L. Autosomal-recessive congenital cerebellar ataxia is caused by mutations in metabotropic glutamate receptor 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 2012, 91(3), 553-564.
- [115] Li, M.; Pang, S.Y.; Song, Y.; King, M.H.; Ho, S.L.; Sham, P.C. Whole exome sequencing identifies a novel mutation in the tsmanglutaminase 6 gene for spinocerebellar ataxia in a Chinese family. *Chin. Genet.*, 2013, 83(3), 269-273.
- [116] Protasova, M.S.; Grigorenko, A.P.; Tyazhikova, T.V.; Andreeva, T.V.; Reshetov, D.A.; Gusev, F.E.; Laptenko, A.E.; Kuznetsova, I.L.; Goltsov, A.Y.; Klyushnikov, S.A.; Il'ianoshkin, S.N.; Rognev, E.I. Whole-genome sequencing identifies a novel ABCB7 gene mutation for X-linked congenital cerebellar ataxia in a large family of Mongolian ancestry. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2016, 24(4), 550-555.
- [117] Duari, A.; Jezierka, J.; Fokkens, M.; Meijer, M.; Schelhaas, H.J.; den Dunnen, W.F.; van Dijk, F.; Verschuuren-Bemelmans, C.; Hageman, G.; van de Vlies, P.; Klusters, B.; van de Warrenburg, B.P.; Kremec, B.; Wijnen, C.; Sinke, R.J.; Swertz, M.A.; Kampinga, H.H.; Boddeke, E.; Verbeek, D.S. Mutations in potassium channel *kcnk3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Ann. Neurol.*, 2012, 72(6), 870-880.
- [118] Lee, Y.C.; Durr, A.; Majczenko, K.; Huang, Y.H.; Liu, Y.C.; Lien, C.C.; Tsai, P.C.; Ichikawa, Y.; Goto, J.; Moniri, M.L.; Li, J.Z.; Chung, M.Y.; Mundwiler, E.; Shakkottai, V.; Liu, T.T.; Tesson, C.; Lu, Y.C.; Brice, A.; Tsuji, S.; Bummeister, M.; Stevanin, G.; Soong, B.W. Mutations in *KCNK3* cause spinocerebellar ataxia type 22. *Ann. Neurol.*, 2012, 72(6), 859-869.
- [119] Henzen, E.L.; Swoboda, K.J.; Hitomi, Y.; Guriere, F.; Nicole, S.; de Vries, B.; Tiziano, F.D.; Fontaine, B.; Walley, N.M.; Heavin, S.; Panagiotakaki, E.; Fion, S.; Abiusi, E.; Di Pietro, L.; Swene, M.T.; Newcomb, T.M.; Viollet, L.; Huff, C.; Jorde, L.B.; Reyna, S.P.; Murphy, K.J.; Shianna, K.V.; Gumbs, C.E.; Little, L.; Silver, K.; Ptáček, L.J.; Haan, J.; Ferrari, M.D.; Bye, A.M.; Herkes, G.K.; Whitelaw, C.M.; Webb, D.; Lynch, B.J.; Ukkala, P.; King, M.D.; Scheffer, I.E.; Neri, G.; Arzimanoglou, A.; van den Maagdenberg, A.M.; Sisodia, S.M.; Mikati, M.A.; Goldstein, D.B. De novo mutations in *ATP1A3* cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat. Genet.*, 2012, 44(9), 1030-1034.
- [120] Doi, H.; Yoshida, K.; Yasuda, T.; Fukuda, M.; Fukuda, Y.; Morita, H.; Ikeda, S.; Kato, R.; Tsurusaki, Y.; Miyake, N.; Saito, H.; Sakai, H.; Miyatake, S.; Shima, M.; Nukina, N.; Koyano, S.; Tsuji, S.; Kuroiwa, Y.; Matsumoto, N. Exome sequencing reveals a homozygous *SYT14* mutation in adult-onset, autosomal-recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011, 89(2), 320-327.
- [121] Pierson, T.M.; Adams, D.; Bonn, F.; Martinelli, P.; Cherukuri, P.F.; Teer, J.K.; Hansen, N.F.; Cruz, P.; Mullikin, J.B.; Blakesley, R.W.; Golas, G.; Kwan, J.; Sandler, A.; Fuentes Fajardo, K.; Markello, T.; Tiffit, C.; Blackstone, C.; Rugari, E.L.; Langer, T.; Gahl, W.A.; Toro, C. Whole-exome sequencing identifies homozygous *AFG3L2* mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial m-AAA proteases. *PLoS Genet.*, 2011, 7(10), e1002325.
- [122] Charlesworth, G.; Angelova, P.R.; Bartolomé-Robledo, F.; Rytan, M.; Trabzun, D.; Stamelou, M.; Abramov, A.Y.; Bhatia, K.P.; Wood, N.W. Mutations in *HPCA* cause autosomal-recessive primary isolated dystonia. *Am. J. Hum. Genet.*, 2015, 96(4), 657-665.
- [123] Fuchs, T.; Saunders-Pullman, R.; Masuho, I.; Luciano, M.S.; Raymond, D.; Factor, S.; Lang, A.E.; Liang, T.W.; Troesch, R.M.; White, S.; Ainehsham, E.; Hervé, D.; Sharma, N.; Ehrlich, M.E.; Martemyanov, K.A.; Bressman, S.B.; Ozdizli, L.J. Mutations in *GNAL* cause primary torsion dystonia. *Nat. Genet.*, 2013, 45(1), 88-92.
- [124] Lohmann, K.; Wilcox, R.A.; Winkler, S.; Ramirez, A.; Rakovic, A.; Park, J.S.; Arns, B.; Lohrann, T.; Gmen, J.; Kasten, M.; Brüggemann, N.; Hagenah, J.; Schmidt, A.; Kaiser, F.J.; Kumar, K.R.; Zschiedrich, K.; Alvarez-Fischer, D.; Ahnmüller, E.; Föhrst, A.; Lang, A.E.; Münchau, A.; Kostic, V.; Simonyan, K.; Agzarian, M.; Ozelius, L.J.; Langeveld, A.P.; Sue, C.M.; Tijssen, M.A.; Klein, C. Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the *TUBB4* gene. *Ann. Neurol.*, 2013, 73(4), 537-545.
- [125] Zech, M.; Lam, D.D.; Francescato, L.; Schormair, B.; Salminen, A.V.; Jochim, A.; Wieland, T.; Lichtner, P.; Peters, A.; Gieger, C.; Lochmüller, H.; Strom, T.M.; Haslinger, B.; Katsanis, N.; Winkelmann, J. Recessive mutations in the $\alpha 3$ (VI) collagen gene *COL6A3* cause early-onset isolated dystonia. *Am. J. Hum. Genet.*, 2015, 96(6), 883-893.
- [126] Zimprich, A.; Benet-Pagés, A.; Strühal, W.; Graf, E.; Eck, S.H.; Offman, M.N.; Haubinger, D.; Spielberger, S.; Schulte, E.C.; Lichtner, P.; Roeske, S.C.; Klopp, N.; Wolf, E.; Seppi, K.; Pirker, W.; Presslauer, S.; Mollenhauer, B.; Katsenschlager, R.; Foki, T.; Hotzy, C.; Reinthaler, E.; Hanjanyan, A.; Kralovics, R.; Petes, A.; Zimprich, F.; Brücke, T.; Poewe, W.; Auff, E.; Trinklwalder, C.; Rost, B.; Ramsay, G.; Winkelmann, J.; Meisinger, T.; Strom, T.M. A mutation in *VPS35*, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011, 89(1), 168-175.
- [127] Vilarinho-Gütel, C.; Wilder, C.; Ross, O.A.; Dachselt, J.C.; Kachergus, J.M.; Lincoln, S.J.; Soto-Oriola, A.I.; Cobb, S.A.; Wilhoite, G.J.; Bacon, J.A.; Behrouz, B.; Melrose, H.L.; Hentati, E.; Puschmann, A.; Evans, D.M.; Conrath,

- E.; Wasserman, W.W.; Aasly, J.O.; Burkhard, P.R.; Djaldetti, R.; Ghika, J.; Hentati, F.; Krygowska-Wajs, A.; Lynch, T.; Melamed, E.; Rajput, A.; Rajput, A.H.; Solida, A.; Wu, R.M.; Uitti, R.J.; Wiszolek, Z.K.; Vingerhoets, F.; Farrer, M.J. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011, 89(1), 162-167.
- [128] Nibbeling, E.A.; Delnooz, C.C.; de Koning, T.J.; Sinke, R.J.; Jirmah, H.A.; Tjssen, M.A.; Verbeek, D.S. Using the shared genetics of dystonia and ataxia to unravel their pathogenesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2017, 75, 22-39.
- [129] Synofzik, M.; Schüle, R. Overcoming the divide between ataxias and spastic paraplegias: Shared phenotypes, genes, and pathways. *Mov. Disord.*, 2017, 32(3), 332-345.
- [130] Saitou, H.; Osaka, H.; Sasaki, M.; Takamachi, J.; Hamada, K.; Yamashita, A.; Shibayama, H.; Shiina, M.; Kondo, Y.; Nishiyama, K.; Tsurusaki, Y.; Miyake, N.; Doi, H.; Ogata, K.; Inoue, K.; Matsumoto, N. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA Polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011, 89(5), 644-651.
- [131] Simons, C.; Wolf, N.I.; McNeil, N.; Cadovic, L.; Devaney, J.M.; Takanoashi, A.; Crawford, J.; Ru, K.; Grimmond, S.M.; Miller, D.; Tonduti, D.; Schmidt, J.L.; Chudnow, R.S.; van Coster, R.; Lagae, L.; Kisler, J.; Sperner, J.; van der Knaap, M.S.; Schiffmann, R.; Taft, R.J.; Vanderver, A. A de novo mutation in the β -tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am. J. Hum. Genet.*, 2013, 92(5), 767-773.
- [132] Hengel, H.; Magee, A.; Mahanah, M.; Vallat, J.M.; Ouvrier, R.; Abu-Rasheed, M.; Mahamid, J.; Schüle, R.; Schulze, M.; Krügeloh-Mann, L.; Bauer, P.; Zächner, S.; Sharkis, R.; Schöls, L. CNTNAP1 mutations cause CNS hypomyelination and neuropathy with or without arthropropo-sis. *Neurol. Genet.*, 2017, 3(2), e144.
- [133] Meng, L.; Doni, T.; Xia, F.; Niu, Z.; Al-Shamsi, A.; Herte-cant, J.; Al-Jasmi, F.; Gibson, J.B.; Nagakura, H.; Zhang, J.; He, W.; Eng, C.; Yang, Y.; Elisei, S.H. Homozygous variants in pyrroline-5-carboxylate reductase 2 (PYCR2) in patients with progressive microcephaly and hypomyelinating leukodystrophy. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2017, 173(2), 460-470.
- [134] Lemke, J.R.; Riech, E.; Scheurenbrand, T.; Schubach, M.; Wilhelm, C.; Steiner, I.; Hansen, J.; Courage, C.; Gallati, S.; Bütki, S.; Strozzi, S.; Simonetti, B.G.; Grunt, S.; Steinlin, M.; Alber, M.; Wolff, M.; Klopstock, T.; Prott, E.C.; Lorenz, R.; Spaich, C.; Roma, S.; Lakshminarasimhan, M.; Käthel, J.; Dorn, T.; Krämer, G.; Synofzik, M.; Becker, F.; Weber, Y.G.; Lerche, H.; Böhm, D.; Biskup, S. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia*, 2012, 53(8), 1387-1398.
- [135] Kodera, H.; Kato, M.; Nord, A.S.; Walsh, T.; Lee, M.; Yamataka, G.; Tohyama, J.; Nakamura, K.; Nakagawa, E.; Ikeda, T.; Ben-Zeev, B.; Lev, D.; Lerman-Sagie, T.; Stausberg, R.; Tanabe, S.; Ueda, K.; Amamoto, M.; Ohta, S.; Nonoda, Y.; Nishiyama, K.; Tsurusaki, Y.; Nakashima, M.; Miyake, N.; Hayasaka, K.; King, M.C.; Matsumoto, N.; Saitou, H. Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, 2013, 54(7), 1262-1269.
- [136] Fernández-Marmiesse, A.; Morey, M.; Pineda, M.; Eiris, J.; Couce, M.L.; Castro-Gago, M.; Fraga, J.M.; Lacerda, L.; Gouveia, S.; Pérez-Poyato, M.S.; Armstrong, J.; Castilleiras, D.; Cocho, J.A. Assessment of a targeted resequencing assay as a support tool in the diagnosis of lysosomal storage disorders. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2014, 9, 59.
- [137] Lieber, D.S.; Calvo, S.E.; Shanahan, K.; Slate, N.G.; Liu, S.; Hershman, S.G.; Gold, N.B.; Chapman, B.A.; Thorburn, D.R.; Berry, G.T.; Schmahmann, J.D.; Borowsky, M.L.; Mueller, D.M.; Sims, K.B.; Mootha, V.K. Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. *Neurology*, 2013, 80(9), 1762-1770.
- [138] Prasad, M.K.; Geoffroy, V.; Vicaire, S.; Jost, B.; Dumas, M.; Le Gras, S.; Switala, M.; Gasse, B.; Laugel-Haushalter, V.; Paschaki, M.; Lohaupt, B.; Drex, D.; Dalstein, A.; Loing, A.; Grollemund, B.; Müller-Bolla, M.; Lopez-Cazaun, S.; Minour, M.; Jang, S.; Ohry, F.; Vogt, V.; Davidian, J.L.; David-Beal, T.; Kaiser, A.S.; Moog, U.; Richard, B.; Morrier, J.J.; Duprez, J.P.; Odent, S.; Baillet-Latrou, L.; Rousset, M.M.; Meramettizian, L.; Tostain, A.; Joseph, C.; Giuliano, F.; Dahlet, J.C.; Courval, A.; El Aloussi, M.; Louina, S.; Soskin, S.; Guffon, N.; Drouot, A.; Doray, B.; Feierabend, S.; Ginglinger, E.; Fournier, B.; de la Dure Molla, M.; Alembik, Y.; Tardieu, C.; Claus, F.; Berdal, A.; Stœtzel, C.; Manière, M.C.; Dollfus, H.; Bloch-Zupan, A. A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with craniofacial involvement. *J. Med. Genet.*, 2016, 53(2), 98-110.
- [139] Todd, E.J.; Yan, K.S.; Ong, R.; Sloc, J.; McGillivray, G.; Bamet, C.P.; Halliloglu, G.; Talim, B.; Akcoran, Z.; Kariminejad, A.; Cairns, A.; Clarke, N.F.; Freckmann, M.L.; Romero, N.B.; Williams, D.; Sewry, C.A.; Colley, A.; Ryan, M.M.; Kiraly-Berri, C.; Sivadorai, P.; Alcock, R.J.; Beeson, D.; Maxwell, S.; Davis, M.R.; Laing, N.G.; Ravenscroft, G. Next generation sequencing in a large cohort of patients presenting with neuromuscular disease before or at birth. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2015, 10, 148.
- [140] Lévesque, S.; Auray-Blas, C.; Gravel, E.; Boutin, M.; Dempsey-Nunez, L.; Jacques, P.E.; Chénier, S.; Larue, S.; Rioux, M.F.; Al-Hertani, W.; Nadeau, A.; Mathieu, J.; Maranda, B.; Désilets, V.; Waters, P.J.; Keutzer, J.; Austin, S.; Kishani, P. Diagnosis of late-onset Pompe disease and other muscle disorders by next-generation sequencing. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2016, 11, 8.
- [141] Effthymiou, S.; Manole, A.; Houlden, H. Next-generation sequencing in neuromuscular diseases. *Curr. Opin. Neurol.*, 2016, 29(5), 527-536.
- [142] Vasi, N.; Laporte, J. Impacts of massively parallel sequencing for genetic diagnosis of neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol.*, 2013, 125(2), 173-185.
- [143] Erman, B.; Bile, I.; Hirschmugl, T.; Salzer, E.; Bortug, H.; Sanal, Ö.; Çağdaş Ayvaz, D.; Tezcan, I.; Bortug, K. Investigation of genetic defects in severe combined immunodeficiency patients from turkey by targeted sequencing. *Scand. J. Immunol.*, 2017, 85(3), 227-234.
- [144] Kroes, H.Y.; Monroe, G.R.; van der Zwaag, B.; Duran, K.J.; de Kovel, C.G.; van Roozmalen, M.J.; Harakalova, M.; Nijman, I.J.; Kloosterman, W.P.; Giles, R.H.; Knoers, N.V.; van Haften, G. Joubert syndrome: genotyping a Northern European patient cohort. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2016, 24(2), 214-220.
- [145] Lupo, V.; Garcia-Garcia, F.; Sando, P.; Tello, C.; Garcia-Romero, M.; Villarreal, L.; Albert, A.; Sivera, R.; Dopazo, J.; Pascual-Pascual, S.I.; Márquez Infante, C.; Casasnovas, C.; Sevilla, T.; Espinós, C. Assessment of targeted next-generation sequencing as a tool for the diagnosis of charcot-marie-tooth disease and hereditary motor neuropathy. *J. Mol. Diagn.*, 2016, 18(2), 225-234.

- [146] Nam, S.H.; Hong, Y.B.; Hyun, Y.S.; Nam, E.; Kwak, G.; Hwang, S.H.; Choi, B.O.; Chung, K.W. Identification of genetic causes of inherited peripheral neuropathies by targeted gene panel sequencing. *Mol. Cells*, **2016**, *39*(5), 382-388.
- [147] Antoniadis, T.; Buxton, C.; Demis, G.; Forrester, N.; Smith, D.; Lunt, P.; Burton-Jones, S. Application of targeted multi-gene panel testing for the diagnosis of inherited peripheral neuropathy provides a high diagnostic yield with unexpected phenotype-genotype variability. *BMC Med. Genet.*, **2015**, *16*, 84, <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0224-8>.
- [148] Morgan, S.; Shoui, M.; Fratta, P.; Sidle, K.; Ornell, R.; Sweeney, M.G.; Shatunov, A.; Spovniem, W.; Jones, A.; Al-Chalabi, A.; Malaspina, A.; Houlden, H.; Hardy, J.; Pittman, A. Investigation of next-generation sequencing technologies as a diagnostic tool for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging*, **2015**, *36*(3), 1600.e5-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.
- [149] Gmzeva, D.; Cans, K.; Spacic-Boskovic, O.; Tejada, M.I.; Gez, J.; Shaw, M.; Corbett, M.; Haan, E.; Thompson, E.; Friend, K.; Hussain, Z.; Hackett, A.; Field, M.; Renieri, A.; Stevenson, R.; Schwartz, C.; Floyd, J.A.; Bentham, J.; Congrove, C.; Keaney, B.; Bhattacharya, S.; Hurles, M.; Raymond, F.L. Targeted next-generation sequencing analysis of 1,000 individuals with intellectual disability. *Hum. Mutat.*, **2015**, *36*(12), 1197-1204.
- [150] An, W.; Zhang, J.; Chang, L.; Zhang, Y.; Wan, Y.; Ren, Y.; Niu, D.; Wu, J.; Zhu, X.; Guo, Y. Mutation analysis of Chinese sporadic congenital sideroblastic anemia by targeted capture sequencing. *J. Hematol. Oncol.*, **2015**, *8*, 55, doi: 10.1186/s13045-015-0154-0.
- [151] Simeoni, I.; Stephens, J.C.; Hu, F.; Deevi, S.V.; Megy, K.; Bariana, T.K.; Lentaigne, C.; Schulman, S.; Sivapalaratnam, S.; Vries, M.J.; Westbury, S.K.; Greene, D.; Papadia, S.; Alessi, M.C.; Atwood, A.P.; Ballmaier, M.; Baynam, G.; Bermejo, E.; Bertoli, M.; Bray, P.F.; Bury, L.; Cattaneo, M.; Collins, P.; Daugherty, L.C.; Favier, R.; French, D.L.; Fuire, B.; Gattens, M.; Germeshausen, M.; Ghevaert, C.; Goodeve, A.C.; Guerrero, J.A.; Hampshire, D.J.; Hart, D.P.; Heemskerk, J.W.; Henskens, Y.M.; Hill, M.; Hogg, N.; Jolley, J.D.; Kahr, W.H.; Kelly, A.M.; Kerr, R.; Kostadima, M.; Kunishima, S.; Lambert, M.P.; Lieser, R.; López, J.A.; Mapeta, R.P.; Mathias, M.; Millar, C.M.; Nathwani, A.; Neerman-Arbez, M.; Nurdan, A.T.; Nurdan, P.; Othman, M.; Peerlinck, K.; Perry, D.J.; Poudel, P.; Reitsma, P.; Rondina, M.T.; Smeethurst, P.A.; Stevenson, W.; Szkotak, A.; Tuna, S.; van Geet, C.; Whitthorn, D.; Wilcox, D.A.; Zhang, B.; Revel-Vilk, S.; Grésle, P.; Bellusimo, D.B.; Penkett, C.J.; Laffan, M.A.; Mumford, A.D.; Rendon, A.; Gomez, K.; Freson, K.; Ouweland, W.H.; Turro, E. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood*, **2016**, *127*(23), 2791-2803.
- [152] Falardeau, F.; Camurri, M.V.; Campese, P.M. Genomic approaches to diagnose rare bone disorders. *Bone*, **2016**, *87*, 3282(16), 30208-302083.
- [153] Sadamanda, S.N.; Foo, J.N.; Toh, M.T.; Cermakova, L.; Trigueros-Motos, L.; Chan, T.; Liang, H.; Collins, J.A.; Gerami, S.; Singaraja, R.R.; Hayden, M.R.; Francis, G.A.; Frohlich, J.; Khor, C.C.; Bunham, L.R. Targeted next-generation sequencing to diagnose disorders of HDL cholesterol. *J. Lipid Res.*, **2015**, *56*(10), 1993-2001.
- [154] Faiza, F.; Vecoli, C.; Foñs, I.; Andressi, M.G. Next generation sequencing in cardiovascular diseases. *World J. Cardiol.*, **2012**, *4*(10), 288-295.
- [155] Lopes, L.R.; Zekavat, A.; Syrris, P.; Hubank, M.; Gumbartokmei, C.; Dalageorgou, C.; Jenkins, S.; McKenna, W.; Plagnol, V.; Elliott, P.M. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J. Med. Genet.*, **2013**, *50*(4), 228-239.
- [156] Mutai, H.; Suzuki, N.; Shimizu, A.; Totsi, C.; Namba, K.; Morimoto, N.; Kudoh, J.; Kaga, K.; Kosaki, K.; Matsunaga, T. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet J. Rare Dis.*, **2013**, *8*, 172.
- [157] Niishi, S.Y.; Hayashi, Y.; Watanabe, M.; Usami, S. Clinical application of a custom AmpliSeq library and ion torrent PGM sequencing to comprehensive mutation screening for deafness genes. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, **2015**, *19*(4), 209-217.
- [158] Fernandez-San Jose, P.; Corton, M.; Blanco-Kelly, F.; Avila-Fernandez, A.; Lopez-Martinez, M.A.; Sanchez-Navarro, I.; Sanchez-Alcudia, R.; Perez-Carro, R.; Zurita, O.; Sanchez-Bolivar, N.; Lopez-Molina, M.I.; Garcia-Sandoval, B.; Riveiro-Alvarez, R.; Ayuso, C. Targeted next-generation sequencing improves the diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa in spanish patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2015**, *56*(4), 2173-2182.
- [159] Weisschuh, N.; Mayer, A.K.; Strom, T.M.; Kohl, S.; Glöckle, N.; Schubach, M.; Andreasson, S.; Bemd, A.; Birch, D.G.; Hamel, C.P.; Heckenlively, J.R.; Jacobson, S.G.; Kamme, C.; Kellner, U.; Kunstmann, E.; Maffei, P.; Reiff, C.M.; Rohrschneider, K.; Rosenberg, T.; Rudolph, G.; Vámos, R.; Varsanyi, B.; Weleber, R.G.; Wissinger, B. Mutation detection in patients with retinal dystrophies using targeted next generation sequencing. *PLoS One*, **2016**, *11*(1), e0145951.
- [160] Bravo-Gil, N.; Méndez-Vidal, C.; Romero-Pérez, L.; González-del Pozo, M.; Rodríguez-de la Rúa, E.; Dopazo, J.; Borrego, S.; Antúfelo, G. Improving the management of inherited retinal dystrophies by targeted sequencing of a population-specific gene panel. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 23910.
- [161] Audo, I.; Bujakowska, K.M.; Léveillard, T.; Mohand-Said, S.; Lanoelot, M.E.; Germain, A.; Antonio, A.; Michiels, C.; Saraiva, J.P.; Letexier, M.; Sahel, J.A.; Bhattacharya, S.S.; Zeitz, C. Development and application of a next-generation-sequencing (NGS) approach to detect known and novel gene defects underlying retinal diseases. *Orphanet J. Rare Dis.*, **2012**, *7*, 8.
- [162] Perez-Carro, R.; Corton, M.; Sánchez-Navarro, I.; Zurita, O.; Sanchez-Bolivar, N.; Sánchez-Alcudia, R.; Lelieveld, S.H.; Aller, E.; Lopez-Martinez, M.A.; López-Molina, M.I.; Fernandez-San Jose, P.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Alvarez, R.; Gilissen, C.; Millan, J.M.; Avila-Fernandez, A.; Ayuso, C. Panel-based NGS reveals novel pathogenic mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 19531.
- [163] Ellingford, J.M.; Barton, S.; Bhaskar, S.; O'Sullivan, J.; Williams, S.G.; Lamb, J.A.; Panda, B.; Sergouniotis, P.; Gillespie, R.L.; Daiger, S.P.; Hall, G.; Gale, T.; Lloyd, L.C.; Bishop, P.N.; Ramsden, S.C.; Black, G.C. Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease. *J. Med. Genet.*, **2016**.
- [164] Tobias, E.S.; McElravy, K. Next generation sequencing for disorders of sex development. *Endocr. Dev.*, **2014**, *27*, 53-62.
- [165] Alvarez-Mom, M.I.; Calvo Escakna, R.; Puig Navarro, O.; Madrigal, I.; Quintela, I.; Amigo, J.; Martínez-Ehrbe, D.; Linder-Lucht, M.; Aznar Lain, G.; Carracedo, A.; Milla, M.

- Rodriguez-Revenas, L. Comprehensive molecular testing in patients with high functioning autism spectrum disorder. *Mutat Res*, 2016, 784-785, 46-52.
- [166] Piccini, B.; Artuso, R.; Lenzi, L.; Guasti, M.; Braccisi, G.; Barni, F.; Casalini, E.; Giglio, S.; Toni, S. Clinical and molecular characterization of a novel *INS* mutation identified in patients with MODY phenotype. *Eur. J. Med. Genet.* 2016, 59(11), 590-595.
- [167] Diociaiuti, A.; El Hachem, M.; Pisaneschi, E.; Giancristoforo, S.; Genovese, S.; Sirleto, P.; Boldrini, R.; Angioni, A. Role of molecular testing in the multidisciplinary diagnostic approach of ichthyosis. *Orphanet J. Rare Dis.* 2016, 11, 4. doi: 10.1186/s13023-016-0384-4.
- [168] Schneider, M.; Halbritter, J.; Phelps, L.G.; Braun, D.A.; Otto, E.A.; Perath, J.D.; Gee, H.Y.; Shendure, J.; O'Roak, B.J.; Lawson, J.A.; Nabhan, M.M.; Soliman, N.A.; Doherty, D.; Hildebrandt, F. Large-scale targeted sequencing comparison highlights extreme genetic heterogeneity in nephronophthisis-related ciliopathies. *J. Med. Genet.* 2016, 53(3), 208-214.
- [169] Yang, H.; Luo, M.; Fu, Y.; Cao, Y.; Yin, K.; Li, W.; Meng, C.; Ma, Y.; Zhang, J.; Fan, Y.; Shu, C.; Chang, Q.; Zhou, Z. Genetic testing of 248 Chinese aortopathy patients using a panel assay. *Sci. Rep.* 2016, 6, 33002.
- [170] McDaniell, R.; Warthen, D.M.; Sanchez-Lara, P.A.; Pai, A.; Kwantz, L.D.; Piccoli, D.A.; Spinner, N.B. *NOTCH2* mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 2006, 79(1), 169-173.
- [171] Isidor, B.; Lindenbaum, P.; Pichon, O.; Béziau, S.; Dina, C.; Jacquemont, S.; Martin-Coignard, D.; Thauvin-Robinet, C.; Le Merrer, M.; Mandel, J.L.; David, A.; Faivre, L.; Cormier-Daire, V.; Redon, R.; Le Caignec, C. Truncating mutations in the last exon of *NOTCH2* cause a rare skeletal disorder with osteopetrosis. *Nat. Genet.* 2011, 43(4), 306-308.
- [172] Majewski, J.; Schwartzentruber, J.A.; Caquere, A.; Patry, L.; Marcadier, J.; Fryns, J.P.; Boycott, K.M.; Ste-Marie, L.G.; McKiernan, F.E.; Marik, I.; Van Esch, H.; Michaud, J.L.; Samuels, M.E. Mutations in *NOTCH2* in families with Hajdu-Cheney syndrome. *Hum. Mutat.* 2011, 32(10), 1114-1117.
- [173] Simpson, M.A.; Irving, M.D.; Asilmaz, E.; Gray, M.J.; Dafou, D.; Elmslie, F.V.; Mansour, S.; Holder, S.E.; Brain, C.E.; Burton, B.K.; Kim, K.H.; Pauli, R.M.; Afimos, S.; Stewart, H.; Kim, C.A.; Holder-Espinouse, M.; Robertson, S.P.; Drake, W.M.; Trembath, R.C. Mutations in *NOTCH2* cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat. Genet.* 2011, 43(4), 303-305.
- [174] Cook, E.H., Jr; Scherer, S.W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, 2008, 455(7215), 919-923.
- [175] Vissers, L.E.; de Vries, B.B.; Veltman, J.A. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J. Med. Genet.* 2010, 47(5), 289-297.
- [176] Koolen, D.A.; Pfundt, R.; de Leeuw, N.; Hehir-Kwa, J.Y.; Nillesen, W.M.; Neefs, I.; Scheltinga, I.; Sintermans, E.; Smeets, D.; Brunner, H.G.; van Kessel, A.G.; Veltman, J.A.; de Vries, B.B. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum. Mutat.* 2009, 30(3), 283-292.
- [177] Sebati, J.; Lakshmi, B.; Malhotra, D.; Troge, J.; Lese-Martin, C.; Walsh, T.; Yamrom, B.; Yoon, S.; Krasnitz, A.; Kendall, J.; Leotta, A.; Pai, D.; Zhang, R.; Lee, Y.H.; Hicks, J.; Spence, S.J.; Lee, A.T.; Paura, K.; Lehtimäki, T.; Ledbetter, D.; Gregersen, P.K.; Bregman, J.; Sutcliffe, J.S.; Jobanputra, V.; Chung, W.; Warburton, D.; King, M.C.; Skuse, D.; Geschwind, D.H.; Gilliam, T.C.; Ye, K.; Wigler, M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 2007, 316(5823), 445-449.
- [178] Marshall, C.R.; Noor, A.; Vincent, J.B.; Lionel, A.C.; Feuk, L.; Skaug, J.; Shago, M.; Moessner, R.; Pinto, D.; Ren, Y.; Thiruvahindrapuram, B.; Fiebig, A.; Schreiber, S.; Friedman, J.; Ketelaars, C.E.; Vos, Y.J.; Ficiccioglu, C.; Kirkpatrick, S.; Nicolson, R.; Sloman, L.; Summers, A.; Gibbons, C.A.; Teebi, A.; Chitayat, D.; Welsberg, R.; Thompson, A.; Vardy, C.; Crosby, V.; Luscombe, S.; Bastjes, R.; Zwaigenbaum, L.; Roberts, W.; Fernandez, B.; Szatmari, P.; Scherer, S.W. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 82(2), 477-488.
- [179] Xu, B.; Roos, J.L.; Levy, S.; van Rensburg, E.J.; Gogos, J.A.; Karayiorgou, M. Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat. Genet.* 2008, 40(7), 880-885.
- [180] Giritlan, S.; Campbell, C.D.; Eichler, E.E. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu. Rev. Genet.* 2011, 45, 203-226.
- [181] Veltman, J.A.; Brunner, H.G. De novo mutations in human genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13(8), 565-575.
- [182] McClellan, J.; King, M.C. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 2010, 141(2), 210-217.
- [183] Acuna-Hidalgo, R.; Bo, T.; Kwint, M.P.; van de Vorst, M.; Pindl, M.; Veltman, J.A.; Hoischen, A.; Vissers, L.E.; Gillissen, C. Post-zygotic point mutations are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am. J. Hum. Genet.* 2015, 97(1), 67-74.
- [184] Campbell, I.M.; Yuan, B.; Robberecht, C.; Pfundt, R.; Szatmari, P.; McEntagart, M.E.; Nagamani, S.C.; Erez, A.; Barlik, M.; Winiowicka-Kowalik, B.; Phelan, K.S.; Pursley, A.N.; Kang, S.H.; Bi, W.; Lakari, S.R.; Bacino, C.A.; Vast, M.; Marik, K.; Patton, M.; Olofinson, P.; Patel, A.; Veltman, J.A.; Cheung, S.W.; Shaw, C.A.; Vissers, L.E.; Vermeesch, J.R.; Lupski, J.R.; Stankiewicz, P. Parental somatic mosaicism is underrecognized and influences recurrence risk of genomic disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 2014, 95(2), 173-182.
- [185] Campbell, I.M.; Shaw, C.A.; Stankiewicz, P.; Lupski, J.R. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet.* 2015, 31(7), 382-392.
- [186] De, S. Somatic mosaicism in healthy human tissues. *Trends Genet.* 2011, 27(6), 217-223.
- [187] Erickson, R.P. Recent advances in the study of somatic mosaicism and diseases other than cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2014, 26, 73-78.
- [188] Erickson, R.P. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat Res.* 2010, 705(2), 96-106.
- [189] Frank, S.A. Evolution in health and medicine: Sackler colloquium: Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107(Suppl. 1), 1725-1730.
- [190] Freed, D.; Stevens, E.L.; Pevsner, J. Somatic mosaicism in the human genome. *Genes (Basel)* 2014, 5(4), 1064-1094.
- [191] Halvorsen, M.; Petrovski, S.; Sheldhaas, R.; Tang, Y.; Crandall, L.; Goldstein, D.; Devinsky, O. Mosaic mutations in early-onset genetic diseases. *Genet. Med.* 2016, 18(7), 746-749.

- [192] Kim, H.J.; Jeon, B.S. Hypothesis: somatic mosaicism and Parkinson disease. *Exp. Neurobiol.*, **2014**, *23*(4), 271-276.
- [193] Oetting, W.S.; Greenblatt, M.S.; Brookes, A.J.; Karchin, R.; Mooney, S.D. Gemline & somatic mosaicism: the 2014 annual scientific meeting of the Human Genome Variation Society. *Hum. Mutat.*, **2015**, *36*(3), 390-393.
- [194] Pagnamenta, A.T.; Lise, S.; Harrison, V.; Stewart, H.; Jayawant, S.; Quaghebeur, G.; Dong, A.T.; Murphy, V.E.; Sadighi Akha, E.; Rimmer, A.; Mathieson, I.; Knight, S.J.; Kini, U.; Taylor, J.C.; Kaye, D.A. Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. *J. Hum. Genet.*, **2012**, *57*(1), 70-72.
- [195] Podari, A.; Froyon, G.D.; Cai, X.; Walsh, C.A. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science*, **2013**, *341*(6141), 1237-1238.
- [196] Jamar, S.S.; Lam, A.T.; Kircher, M.; D'Gama, A.M.; Wang, J.; Barry, B.J.; Zhang, X.; Hill, R.S.; Partlow, J.N.; Rozzo, A.; Servattali, S.; Mehta, B.K.; Topcu, M.; Amrom, D.; Andermann, E.; Dan, B.; Parini, E.; Guerrini, R.; Scheffer, L.E.; Berkovic, S.F.; Leventer, R.J.; Shen, Y.; Wu, B.L.; Baskovich, A.J.; Sahin, M.; Chang, B.S.; Bamshad, M.; Nickerson, D.A.; Shendure, J.; Podari, A.; Yu, T.W.; Walsh, C.A. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N. Engl. J. Med.*, **2014**, *371*(8), 733-743.
- [197] Sica, F.; Kelemen, A.; Genton, P.; Das, S.; Mei, D.; Moro, F.; Dobyns, W.B.; Guerrini, R. Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology*, **2003**, *61*(8), 1042-1046.
- [198] Lim, J.S.; Kim, W.I.; Kang, H.C.; Kim, S.H.; Park, A.H.; Park, E.K.; Cho, Y.W.; Kim, S.; Kim, H.M.; Kim, J.A.; Kim, J.; Rhee, H.; Kang, S.G.; Kim, H.D.; Kim, D.; Kim, D.S.; Lee, J.H. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat. Med.*, **2015**, *21*(4), 395-400.
- [199] Mirza, G.M.; Conti, V.; Timms, A.E.; Smyser, C.D.; Ahmed, S.; Carter, M.; Barnett, S.; Hufnagel, R.B.; Goldstein, A.; Narumi-Kishimoto, Y.; Olds, C.; Collins, S.; Johnston, G.; Deleuz, J.F.; Nitschke, P.; Friend, K.; Harris, C.; Goetsch, A.; Marín, B.; Boyle, E.A.; Parrini, E.; Mei, D.; Tattini, L.; Slavotinek, A.; Blair, E.; Barnett, C.; Shendure, J.; Chelly, J.; Dobyns, W.B.; Guerrini, R. Characterization of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit; PIK3R2; in perilymphatic polymicrogyria: a next-generation sequencing study. *Lancet Neurol.*, **2015**, *14*(12), 1182-1195.
- [200] Sarwat, H.B.; Flores-Sarwat, L. Infantile tauopathies: Hemimegalencephaly; tuberos sclerosis complex; focal cortical dysplasia 2; ganglioglioma. *Brain Dev.*, **2015**, *37*(6), 553-562.
- [201] Lindhout, D. Somatic mosaicism as a basic epileptogenic mechanism? *Brain*, **2008**, *131*(Pt 4), 900-901.
- [202] Depienne, C.; Trouillard, O.; Gourfinkel-An, I.; Saint-Martin, C.; Bouteiller, D.; Graber, D.; Barthez-Carpentier, M.A.; Gautier, A.; Villeneuve, N.; Dravet, C.; Livet, M.O.; Rivier-Ringenbach, C.; Adam, C.; Dupont, S.; Baulac, S.; Héron, D.; Nabbout, R.; Leguenn, E. Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *J. Med. Genet.*, **2010**, *47*(6), 404-410.
- [203] Pieras, J.I.; Muñoz-Cabello, B.; Borrego, S.; Marcos, I.; Sanchez, J.; Madruga, M.; Antónolo, G. Somatic mosaicism for Y120X mutation in the MECP2 gene causes atypical Rett syndrome in a male. *Brain Dev.*, **2011**, *33*(7), 608-611.
- [204] Kato, T.; Morisada, N.; Nagase, H.; Nishiyama, M.; Toyoshima, D.; Nakagawa, T.; Maruyama, A.; Fu, X.J.; Nozu, K.; Wada, H.; Takada, S.; Ejima, K. Somatic mosaicism of a CDKL5 mutation identified by next-generation sequencing. *Brain Dev.*, **2015**, *37*(9), 911-915.
- [205] Milh, M.; Lacoste, C.; Cacciagli, P.; Abidi, A.; Suteu-Sando, I.; Tzelepis, I.; Colin, E.; Badens, C.; Aferjias, J.; Coesler, A.D.; Dailland, T.; Lesca, G.; Philip, N.; Villard, L. Variable clinical expression in patients with mosaicism for KCNQ2 mutations. *Am. J. Med. Genet. A.*, **2015**, *167A*(10), 2314-2318.
- [206] Terracciano, A.; Trivisano, M.; Cusmai, R.; De Palma, L.; Fusco, L.; Compagnacci, C.; Bertini, E.; Vigevano, F.; Specchio, N. PCDH19-related epilepsy in two mosaic male patients. *Epilepsia*, **2016**, *57*(3), e51-e55.
- [207] Zarem, A.; Lev, D.; Blumkin, L.; Goldberg-Stern, H.; Michaeli-Yosef, Y.; Halevy, A.; Kivity, S.; Nakamura, K.; Matsumoto, N.; Lehinkevich-Silver, E.; Saitou, H.; Lerman-Sagie, T. Paternal gemline mosaicism of a CN2NA mutation results in Ohtahara syndrome in half siblings. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, **2014**, *18*(5), 567-571.
- [208] Sala Frigerio, C.; Lau, P.; Troakes, C.; Deramecourt, V.; Gele, P.; Van Loo, P.; Voet, T.; De Strooper, B. On the identification of low allele frequency mosaic mutations in the brains of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dem.*, **2015**, *11*(11), 1265-1276.
- [209] Beck, J.A.; Poulter, M.; Campbell, T.A.; Uphill, J.B.; Adanson, G.; Geddes, J.F.; Revez, T.; Davis, M.B.; Wood, N.W.; Collinge, J.; Tabrizi, S.J. Somatic and gemline mosaicism in sporadic early-onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **2004**, *13*(12), 1219-1224.
- [210] Erdmann, J.; Stark, K.; Esslinger, U.B.; Rumpf, P.M.; Koehling, D.; De Wit, C.; Kaiser, F.J.; Brasnholz, D.; Madack, A.; Fischer, M.; Zimmermann, M.E.; Tenstedt, S.; Graf, E.; Eck, S.; Abehrouz, Z.; Nahrstedt, J.; Wilkenborg, C.; Bruse, P.; Braeme, I.; Nöthen, M.M.; Hofmann, P.; Braund, P.S.; Mergia, E.; Reinhard, W.; Burgdorf, C.; Schreiber, S.; Balmford, A.J.; Hall, A.S.; Bertram, L.; Steinhausen-Thiessen, E.; Li, S.C.; März, W.; Reilly, M.; Kathiresan, S.; McPherson, R.; Walter, U.; Ott, J.; Samani, N.J.; Strom, T.M.; Maitinger, T.; Hengstenberg, C.; Schunkert, H. Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. *Nature*, **2013**, *504*(7480), 432-436.
- [211] Tang, B.; Xiong, H.; Sun, P.; Zhang, Y.; Wang, D.; Hu, Z.; Zhu, Z.; Ma, H.; Pan, Q.; Xia, J.H.; Xia, K.; Zhang, Z. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **2006**, *15*(11), 1816-1825.
- [212] Cooper, D.N.; Krawczak, M.; Polychronakos, C.; Tyler-Smith, C.; Kehrer-Sawatzki, H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum. Genet.*, **2013**, *132*(10), 1077-1130.
- [213] Posey, J.E.; Harel, T.; Liu, P.; Rosenfeld, J.A.; James, R.A.; Coban Akdemir, Z.H.; Walkiewicz, M.; Bi, W.; Xiao, R.; Ding, Y.; Xia, F.; Beaudet, A.L.; Muzny, D.M.; Gibbs, R.A.; Boerwinkle, E.; Eng, C.M.; Sutton, V.R.; Shaw, C.A.; Plon, S.E.; Yang, Y.; Lupski, J.R. Resolution of disease phenotypes resulting from multilocus genomic variation. *N. Engl. J. Med.*, **2017**, *376*(1), 21-31.
- [214] Bakci, T.B.; Hartley, T.; Xi, Y.; Dymont, D.A.; Beaulieu, C.L.; Bernier, F.P.; Dupuis, L.; Horvath, G.A.; Mendonza-Londono, R.; Prasad, C.; Richer, J.; Yang, X.R.; Armour, C.M.; Bareke, E.; Fernandez, B.A.; McMillan, H.J.; Lamont, R.E.; Majewski, J.; Paoosong, J.S.; Prasad, A.N.; Rupp, C.A.; Schwartzentruber, J.; Smith, A.C.; Tétreault, M. Care4Rare Canada Consortium; Innes, A.M.;

- Boycott, K.M. Debunking Occam's razor: Diagnosing multiple genetic diseases in families by whole-exome sequencing. *Clin. Genet.*, 2017.
- [215] Fernandez, B.A.; Green, J.S.; Bursley, F.; Barrett, B.; MacMillan, A.; McColl, S.; Fernandez, S.; Rahman, P.; Mahoney, K.; Pereira, S.L.; Scherer, S.W.; Boycott, K.M.; Woods, M.O. Adult siblings with homozygous G6PC3 mutations expand our understanding of the severe congenital neutropenia type 4 (SCN4) phenotype. *BMC Med. Genet.*, 2012, 13, 111.
- [216] Mackenroth, L.; Fischer-Zirnsak, B.; Egerer, J.; Hecht, J.; Kalinich, T.; Stenzel, W.; Spors, B.; von Moers, A.; Mundlos, S.; Kornak, U.; Gemrah, C.; Horn, D. An overlapping phenotype of Osteogenesis imperfecta and Ehlers-Danlos syndrome due to a heterozygous mutation in COL1A1 and biallelic missense variants in TNXB identified by whole exome sequencing. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2016, 170(4), 1080-1085.
- [217] Craig, W.J.; Graham, B.H.; Wong, L.J.; Scaglia, F.; Lewis, R.A.; Bonnen, P.E. Exome sequencing of a patient with suspected mitochondrial disease reveals a likely multigenic etiology. *BMC Med. Genet.*, 2013, 14, 83.
- [218] Lal, D.; Neubauer, B.A.; Toliat, M.R.; Altmüller, J.; Thiele, H.; Nürnberg, P.; Kamrath, C.; Schöner, A.; Sander, T.; Hahn, A.; Nothnagel, M. Increased probability of co-occurrence of two rare diseases in consanguineous families and resolution of a complex phenotype by next generation sequencing. *PLoS One*, 2016, 11(1), e0146040.
- [219] Armour, C.M.; Smith, A.; Harley, T.; Chardon, J.W.; Sawyer, S.; Schwatzenhuber, J.; Hennekam, R.; Majewski, J.; Bulman, D.E.; Suri, M.; Boycott, K.M. Syndrome disintegration: Exome sequencing reveals that Fitzsimmons syndrome is a co-occurrence of multiple events. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2016, 170(7), 1820-1825.
- [220] Rilstone, J.J.; Alkhatir, R.A.; Minasian, B.A. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 368(6), 543-550.
- [221] Bosch, A.M.; Stroek, K.; Abeling, N.G.; Waterham, H.R.; Ulat, L.; Wanders, R.J. The Brown-Vialetto-Van Laere and Fazio Londe syndrome revisited: natural history, genetics, treatment and future perspectives. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2012, 7, 83.
- [222] Akhurst, R.J.; Hata, A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, 11(10), 790-811.
- [223] MacKenzie, A.; Boycott, K. MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2012, 367(14), 1364-1365.
- [224] Beaulieu, C.L.; Samuels, M.E.; Ekins, S.; McMaster, C.R.; Edwards, A.M.; Krainer, A.R.; Hicks, G.G.; Frey, B.J.; Boycott, K.M.; MacKenzie, A.E. A generalizable pre-clinical research approach for orphan disease therapy. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2012, 7, 39.
- [225] Farooq, F.; Balabanian, S.; Liu, X.; Holcik, M.; MacKenzie, A. p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes SMN mRNA through RNA binding protein HuR. *Hum. Mol. Genet.*, 2009, 18(21), 4035-4045.
- [226] Farooq, F.; Molina, F.A.; Hadwen, J.; MacKenzie, D.; Witherspoon, L.; Osmond, M.; Holcik, M.; MacKenzie, A. Prolactin increases SMN expression and survival in a mouse model of severe spinal muscular atrophy via the STAT5 pathway. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121(8), 3042-3050.
- [227] Naldini, L. Medicine. A comeback for gene therapy. *Science*, 2009, 326(5954), 805-806.
- [228] Herzog, R.W.; Cao, O.; Srivastava, A. Two decades of clinical gene therapy—success is finally mounting. *Discov. Med.*, 2010, 9(45), 105-111.
- [229] Kumar, S.R.; Makusick, D.M.; Biswas, M.; High, K.A.; Herzog, R.W. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2016, 3, 16034.
- [230] Swiech, L.; Heidenreich, M.; Banerjee, A.; Habib, N.; Li, Y.; Trombetta, J.; Sur, M.; Zhang, F. In situ interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33(1), 102-106.
- [231] Yin, H.; Xue, W.; Chen, S.; Bogomol, R.L.; Benedetti, E.; Grompe, M.; Kotliansky, V.; Sharp, P.A.; Jacks, T.; Anderson, D.G. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32(6), 551-553.
- [232] Petrikin, J.E.; Willig, L.K.; Smith, L.D.; Kingsmore, S.F. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin. Perinatol.*, 2015, 39(8), 623-631.
- [233] Francescato, L.; Katsanis, N. Newborn screening and the era of medical genomics. *Semin. Perinatol.*, 2015, 39(8), 617-622.
- [234] Saunders, C.J.; Miller, N.A.; Soden, S.E.; Dinwiddie, D.L.; Noll, A.; Alnadi, N.A.; Andrews, N.; Pattenon, M.L.; Krivohlavik, L.A.; Fellis, J.; Humphray, S.; Saffrey, P.; Kingsbury, Z.; Weir, J.C.; Betley, J.; Grocock, R.J.; Margulies, E.H.; Farrow, E.G.; Atman, M.; Safina, N.P.; Petrikin, J.E.; Hall, K.P.; Kingsmore, S.F. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci. Transl. Med.*, 2012, 4(154), 154ra135.
- [235] Willig, L.K.; Petrikin, J.E.; Smith, L.D.; Saunders, C.J.; Thiffault, I.; Miller, N.A.; Soden, S.E.; Cakici, J.A.; Herd, S.M.; Twist, G.; Noll, A.; Creed, M.; Albs, P.M.; Carpenter, S.L.; Clements, M.A.; Fischer, R.T.; Hays, J.A.; Kibride, H.; McDonough, R.J.; Rosterman, J.L.; Tsai, S.L.; Zellmer, L.; Farrow, E.G.; Kingsmore, S.F. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *Lancet Respir. Med.*, 2015, 3(5), 377-387.
- [236] Hunting down my son's killer. <http://matt.might.net/articles/my-sonkiller/>. Accessed December 25th, 2013.
- [237] Might, M.; Wiley, M. The shifting model in clinical diagnostics: how next-generation sequencing and families are altering the way rare diseases are discovered, studied, and treated. *Genet. Med.*, 2014, 16(10), 736-737.
- [238] Enns, G.M.; Shashi, V.; Bainbridge, M.; Gambello, M.J.; Zahir, F.R.; Bast, T.; Crimian, R.; Schoch, K.; Platt, J.; Cox, R.; Bemstein, J.A.; Savina, M.; Walter, R.S.; Bibb, A.; Jones, M.; Hegde, M.; Graham, B.H.; Need, A.C.; Oviedo, A.; Schaaf, C.P.; Boyle, S.; Butte, A.J.; Chen, R.; Chen, R.; Clark, M.J.; Haraksingh, R.; Cowan, T.M.; He, P.; Langlois, S.; Zoghbi, H.Y.; Snyder, M.; Gibbs, R.A.; Freeze, H.H.; Goldstein, D.B. Mutations in NGLY1 cause an inherited disorder of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Genet. Med.*, 2014, 16(10), 751-758.
- [239] Loomis, E.W.; Ekl, J.S.; Peluso, P.; Yin, J.; Hickey, L.; Rank, D.; McCallum, S.; Hagerman, R.J.; Tassone, F.; Hagerman, P.J. Sequencing the unsequenceable: expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene. *Genome Res.*, 2013, 23(1), 121-128.

- [240] McCarthy, A. Third generation DNA sequencing: Pacific biosciences' single molecule real time technology. *Chem Biol*. 2010, 2013, *Volume 17*(issue 7), 675-676.
- [241] Rhoads, A.; Au, K.F. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(5), 278-289.
- [242] Neph, S.; Vierstra, J.; Stergachis, A.B.; Reynolds, A.P.; Haugen, E.; Vernot, B.; Thurman, R.E.; John, S.; Sandstrom, R.; Johnson, A.K.; Maurano, M.T.; Humbert, R.; Rynes, E.; Wang, H.; Vong, S.; Lee, K.; Bates, D.; Diegel, M.; Roach, V.; Dunn, D.; Neri, J.; Schafer, A.; Hansen, R.S.; Kutayvin, T.; Giste, E.; Weaver, M.; Canfield, T.; Sabo, P.; Zhang, M.; Balasundaram, G.; Byrnes, R.; MacCoss, M.J.; Akey, J.M.; Bender, M.A.; Groudine, M.; Kaul, R.; Stamatoyanopoulos, J.A. An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. *Nature*, 2012, 489(7414), 83-90.
- [243] Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 2009, 10(1), 57-63.
- [244] Carthew, R.W.; Sontheimer, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4), 642-655.
- [245] Lin, Z.; Murtaza, I.; Wang, K.; Jiao, J.; Gao, J.; Li, P.F. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106(29), 12103-12108.
- [246] Castanotto, D.; Rossi, J.J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 2009, 457(7228), 426-433.
- [247] Kernohan, K.D.; Fréard, L.; Zappala, Z.; Hartley, T.; Smith, K.S.; Wagner, J.; Xu, H.; McBride, A.; Bourque, P.R.; Consortium, C.R.; Bennett, S.A.; Dymont, D.A.; Boycott, K.M.; Montgomery, S.B.; Warman Chardon, J. Whole-transcriptome sequencing in blood provides a diagnosis of spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy. *Hum. Mutat.*, 2017, 38(6), 611-614.
- [248] Cropley, J.E.; Martin, D.I.; Suter, C.M. Germline epimutation in humans. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(12), 1861-1868.
- [249] Suter, C.M.; Martin, D.I. Inherited epimutation or a haplotypic basis for the propensity to silence? *Nat. Genet.*, 2007, 39(5), 573.
- [250] Laffita-Mesa, J.M.; Bauer, P.O.; Kourí, V.; Peña Serrano, L.; Roskams, J.; Almaguer Gotay, D.; Montes Brown, J.C.; Martínez Rodríguez, P.A.; González-Zaldivar, Y.; Almaguer Mederos, L.; Cuello-Almarales, D.; Aguiar Santiago, J. Epigenetics DNA methylation in the core ataxin-2 gene promoter: novel physiological and pathological implications. *Hum. Genet.*, 2012, 131(4), 625-638.
- [251] Zhou, H.; Brockington, M.; Jungbluth, H.; Monk, D.; Stunier, P.; Sewry, C.A.; Moore, G.E.; Munkzi, F. Epigenetic allele silencing unvels recessive RYR1 mutations in core myopathies. *Am. J. Hum. Genet.*, 2006, 79(5), 859-868.
- [252] Rokach, O.; Sekulic-Jablanovic, M.; Voermans, N.; Wilmshurst, J.; Pilly, K.; Heytens, L.; Zhou, H.; Muntoni, F.; Gästel, M.; Nevo, Y.; Mitrani-Rosenbaum, S.; Attali, R.; Finotti, A.; Gambari, R.; Mosca, B.; Jungbluth, H.; Zerzaf, F.; Treves, S. Epigenetic changes as a common trigger of muscle weakness in congenital myopathies. *Hum. Mol. Genet.*, 2015, 24(16), 4636-4647.



8. REFERENCIAS



1. Klug A. Rosalind Franklin and the discovery of the structure of DNA. *Nature*. 1968;219(5156):808-810 passim. doi:10.1038/219808a0
2. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-738. doi:10.1038/171737a0
3. Watson JD, Crick FHC. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4361):964-967. doi:10.1038/171964b0
4. Meselson M, Stahl FW. THE REPLICATION OF DNA IN ESCHERICHIA COLI*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1958;44(7):671-682.
5. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(2):560-564. doi:10.1073/pnas.74.2.560
6. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
7. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59. doi:10.1002/cpmb.59
8. Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Rev Anal Chem*. 2013;6(1):287-303. doi:10.1146/annurev-anchem-062012-092628
9. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
10. McBride LJ, Koepf SM, Gibbs RA, et al. Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin Chem*. 1989;35(11):2196-2201.
11. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998;8(3):186-194.

12. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-351. doi:10.1038/nrg.2016.49
13. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nat Protoc.* 2017;12(2):213-218. doi:10.1038/nprot.2016.182
14. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
15. Asan, Xu Y, Jiang H, et al. Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms. *Genome Biol.* 2011;12(9):R95. doi:10.1186/gb-2011-12-9-r95
16. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol.* 2011;12(2):217. doi:10.1186/gb-2011-12-2-217
17. Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2013;110(1):3-24. doi:10.1016/j.ymgme.2013.04.024
18. de Koning TJ, Jongbloed JDH, Sikkema-Raddatz B, Sinke RJ. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(1):61-70. doi:10.1586/14737159.2015.976555
19. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135-1145. doi:10.1038/nbt1486
20. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
21. Li H, Ruan J, Durbin R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res.* 2008;18(11):1851-1858. doi:10.1101/gr.078212.108

22. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-380. doi:10.1038/nature03959
23. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *PNAS*. 2003;100(15):8817-8822. doi:10.1073/pnas.1133470100
24. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics*. 2009;93(2):105-111. doi:10.1016/j.ygeno.2008.10.003
25. Adessi C, Matton G, Ayala G, et al. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(20):e87.
26. Fuller CW, Middendorf LR, Benner SA, et al. The challenges of sequencing by synthesis. *Nat Biotechnol*. 2009;27(11):1013-1023. doi:10.1038/nbt.1585
27. Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J Microbiol*. 2016;56(4):394-404. doi:10.1007/s12088-016-0606-4
28. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-352. doi:10.1038/nature10242
29. Pennisi E. Genomics. Semiconductors inspire new sequencing technologies. *Science*. 2010;327(5970):1190. doi:10.1126/science.327.5970.1190
30. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour*. 2011;11(5):759-769. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x
31. Milos PM. Emergence of single-molecule sequencing and potential for molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9(7):659-666. doi:10.1586/erm.09.50

32. Clarke J, Wu H-C, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*. 2009;4(4):265-270. doi:10.1038/nnano.2009.12
33. Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009;323(5910):133-138. doi:10.1126/science.1162986
34. Hood L, Rowen L. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med*. 2013;5(9):79. doi:10.1186/gm483
35. Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M. Shotgun sequencing of the human genome. *Science*. 1998;280(5369):1540-1542. doi:10.1126/science.280.5369.1540
36. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. doi:10.1038/35057062
37. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-945. doi:10.1038/nature03001
38. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017;550(7676):345-353. doi:10.1038/nature24286
39. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 2011;470(7333):187-197. doi:10.1038/nature09792
40. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet*. 2014;23(22):5866-5878. doi:10.1093/hmg/ddu309
41. A recount of human genes ups the number to at least 46,831. Science News. Published September 17, 2018. Accessed March 22, 2020. <https://www.sciencenews.org/article/recount-human-genes-ups-number-least-46831>

42. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(7):3353-3364. doi:10.1093/nar/gkz097
43. GENCODE - Human Release Statistics. Accessed March 22, 2020. <https://www.encodegenes.org/human/stats.html>
44. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human Genome Sequencing in Health and Disease. *Annual Review of Medicine.* 2012;63(1):35-61. doi:10.1146/annurev-med-051010-162644
45. Garrod AE. About Alkaptonuria. *Med Chir Trans.* 1902;85:69-78.
46. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic analysis in the age of human genome sequencing. *Cell.* 2019;177(1):70-84. doi:10.1016/j.cell.2019.02.032
47. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291. doi:10.1038/nature19057
48. Levy S, Sutton G, Ng PC, et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.* 2007;5(10):e254. doi:10.1371/journal.pbio.0050254
49. Abel HJ, Larson DE, Chiang C, et al. Mapping and characterization of structural variation in 17,795 deeply sequenced human genomes. *bioRxiv.* Published online December 31, 2018:508515. doi:10.1101/508515
50. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491(7422):56-65. doi:10.1038/nature11632
51. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061-1073. doi:10.1038/nature09534
52. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature.* 2010;467(7311):52-58. doi:10.1038/nature09298

53. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-796. doi:10.1038/nature02168
54. Manolio TA, Collins FS. The HapMap and Genome-Wide Association Studies in Diagnosis and Therapy. *Annu Rev Med*. 2009;60:443-456. doi:10.1146/annurev.med.60.061907.093117
55. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-753. doi:10.1038/nature08494
56. Siva N. 1000 Genomes project. *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):256. doi:10.1038/nbt0308-256b
57. Raney BJ, Cline MS, Rosenbloom KR, et al. ENCODE whole-genome data in the UCSC genome browser (2011 update). *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D871-D875. doi:10.1093/nar/gkq1017
58. ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. 2004;306(5696):636-640. doi:10.1126/science.1105136
59. Qu H, Fang X. A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013;11(3):135-141. doi:10.1016/j.gpb.2013.05.001
60. Stoneking M, Krause J. Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(9):603-614. doi:10.1038/nrg3029
61. Kitts A, Sherry S. *The Single Nucleotide Polymorphism Database (DbSNP) of Nucleotide Sequence Variation*. National Center for Biotechnology Information (US); 2011. Accessed April 21, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>
62. ExAC project pins down rare gene variants. *Nature News*. 2016;536(7616):249. doi:10.1038/536249a
63. Song W, Gardner SA, Hovhannisyanyan H, et al. Exploring the landscape of pathogenic genetic variation in the ExAC population database:

- insights of relevance to variant classification. *Genet Med.* 2016;18(8):850-854. doi:10.1038/gim.2015.180
64. Tarailo-Graovac M, Zhu JYA, Matthews A, van Karnebeek CDM, Wasserman WW. Assessment of the ExAC data set for the presence of individuals with pathogenic genotypes implicated in severe Mendelian pediatric disorders. *Genetics in Medicine.* 2017;19(12):1300-1308. doi:10.1038/gim.2017.50
65. GnomAD Resource Introduced at ASHG Meeting, Doubles ExAC Dataset. GenomeWeb. Accessed April 21, 2020. <https://www.genomeweb.com/sequencing/gnomad-resource-introduced-ashg-meeting-doubles-exac-dataset>
66. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv*. Published online January 30, 2019:531210. doi:10.1101/531210
67. Johnston JJ, Biesecker LG. Databases of genomic variation and phenotypes: existing resources and future needs. *Hum Mol Genet.* 2013;22(R1):R27-R31. doi:10.1093/hmg/ddt384
68. DNA Sequencing Costs: Data. Genome.gov. Accessed April 21, 2020. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>
69. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, Auerbach RK, Gerstein MB. The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biol.* 2011;12(8):125. doi:10.1186/gb-2011-12-8-125
70. Pabinger S, Dander A, Fischer M, et al. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Brief Bioinformatics.* 2014;15(2):256-278. doi:10.1093/bib/bbs086
71. Pavlopoulos GA, Oulas A, Iacucci E, et al. Unraveling genomic variation from next generation sequencing data. *BioData Mining.* 2013;6(1):13. doi:10.1186/1756-0381-6-13

72. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(1):132. doi:10.3390/jcm9010132
73. Patel RK, Jain M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLoS One*. 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0030619
74. Zhou Q, Su X, Wang A, Xu J, Ning K. QC-Chain: fast and holistic quality control method for next-generation sequencing data. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60234. doi:10.1371/journal.pone.0060234
75. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Published October 11, 2018. Accessed October 11, 2018. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
76. Ameer A, Che H, Martin M, et al. De Novo Assembly of Two Swedish Genomes Reveals Missing Segments from the Human GRCh38 Reference and Improves Variant Calling of Population-Scale Sequencing Data. *Genes (Basel)*. 2018;9(10). doi:10.3390/genes9100486
77. Flicek P, Birney E. Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature Methods*. 2009;6(11):S6-S12. doi:10.1038/nmeth.1376
78. Schneider V, Church D. *Genome Reference Consortium*. National Center for Biotechnology Information (US); 2013. Accessed March 23, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153600/>
79. Human Genome Overview - Genome Reference Consortium. Accessed April 21, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>
80. Regier AA, Farjoun Y, Larson DE, et al. Functional equivalence of genome sequencing analysis pipelines enables harmonized variant calling across human genetics projects. *Nature Communications*. 2018;9(1):1-8. doi:10.1038/s41467-018-06159-4

81. Zook JM, Chapman B, Wang J, et al. Integrating human sequence data sets provides a resource of benchmark SNP and indel genotype calls. *Nature Biotechnology*. 2014;32(3):246-251. doi:10.1038/nbt.2835
82. Tian S, Yan H, Kalmbach M, Slager SL. Impact of post-alignment processing in variant discovery from whole exome data. *BMC Bioinformatics*. 2016;17(1):403. doi:10.1186/s12859-016-1279-z
83. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
84. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110
85. Picard Tools - By Broad Institute. Accessed March 15, 2019. <http://broadinstitute.github.io/picard/>
86. Abril JF, Castellano S. Genome Annotation. In: Ranganathan S, Gribskov M, Nakai K, Schönbach C, eds. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Academic Press; 2019:195-209. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20226-4
87. Hwang S, Kim E, Lee I, Marcotte EM. Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standard personal exome variants. *Scientific Reports*. 2015;5(1):1-8. doi:10.1038/srep17875
88. Danecek P, Auton A, Abecasis G, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156-2158. doi:10.1093/bioinformatics/btr330
89. de Sá PHCG, Guimarães LC, das Graças DA, et al. Chapter 11 - Next-Generation Sequencing and Data Analysis: Strategies, Tools, Pipelines and Protocols. In: Barh D, Azevedo V, eds. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Academic Press; 2018:191-207. doi:10.1016/B978-0-12-804659-3.00011-7

90. Scherer SW, Lee C, Birney E, et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet.* 2007;39(7 Suppl):S7-15. doi:10.1038/ng2093
91. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-3814. doi:10.1093/nar/gkg509
92. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
93. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics.* 2014;46(3):310-315. doi:10.1038/ng.2892
94. González-Pérez A, López-Bigas N. Improving the Assessment of the Outcome of Nonsynonymous SNVs with a Consensus Deleteriousness Score, Condel. *The American Journal of Human Genetics.* 2011;88(4):440-449. doi:10.1016/j.ajhg.2011.03.004
95. Yang H, Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc.* 2015;10(10):1556-1566. doi:10.1038/nprot.2015.105
96. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164. doi:10.1093/nar/gkq603
97. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393
98. Brandt T, Sack LM, Arjona D, et al. Adapting ACMG/AMP sequence variant classification guidelines for single-gene copy number variants. *Genetics in Medicine.* 2020;22(2):336-344. doi:10.1038/s41436-019-0655-2
99. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation

- of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
100. Horton RH, Lucassen AM. Recent developments in genetic/genomic medicine. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(5):697-708. doi:10.1042/CS20180436
 101. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis E. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell.* 2013;155(1):27-38. doi:10.1016/j.cell.2013.09.006
 102. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC.* 2018;29(1):4-14.
 103. Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(1):2-5. doi:10.1038/ejhg.2015.226
 104. McConkie-Rosell A, Hooper SR, Pena LDM, et al. Psychosocial Profiles of Parents of Children with Undiagnosed Diseases: Managing Well or Just Managing? *J Genet Couns.* 2018;27(4):935-946. doi:10.1007/s10897-017-0193-5
 105. Reid ES, Papandreou A, Drury S, et al. Advantages and pitfalls of an extended gene panel for investigating complex neurometabolic phenotypes. *Brain.* 2016;139(11):2844-2854. doi:10.1093/brain/aww221
 106. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2013;34(7):1035-1042. doi:10.1002/humu.22332
 107. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, et al. A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat.* 2013;34(12):1721-1726. doi:10.1002/humu.22450

108. Bean LJH, Funke B, Carlston CM, et al. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2020;22(3):453-461. doi:10.1038/s41436-019-0666-z
109. Lucarelli M, Porcaro L, Biffignandi A, et al. A New Targeted CFTR Mutation Panel Based on Next-Generation Sequencing Technology. *J Mol Diagn.* 2017;19(5):788-800. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.06.002
110. Dohrn MF, Glöckle N, Mulahasanovic L, et al. Frequent genes in rare diseases: panel-based next generation sequencing to disclose causal mutations in hereditary neuropathies. *J Neurochem.* 2017;143(5):507-522. doi:10.1111/jnc.14217
111. Komlosi K, Diederich S, Fend-Guella DL, et al. Targeted next-generation sequencing analysis in couples at increased risk for autosomal recessive disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):23. doi:10.1186/s13023-018-0763-0
112. Lepri FR, Scavelli R, Digilio MC, et al. Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. *BMC Med Genet.* 2014;15:14. doi:10.1186/1471-2350-15-14
113. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol.* 2015;16(1). doi:10.1186/s13059-015-0693-2
114. ENCODE: Deciphering Function in the Human Genome. Genome.gov. Accessed April 22, 2020. <https://www.genome.gov/27551473/genome-advance-of-the-month-encode-deciphering-function-in-the-human-genome>
115. Chen Y-C, Liu T, Yu C-H, Chiang T-Y, Hwang C-C. Effects of GC Bias in Next-Generation-Sequencing Data on De Novo Genome Assembly. *PLOS ONE.* 2013;8(4):e62856. doi:10.1371/journal.pone.0062856
116. Fernandez-Marmiesse A, Gouveia S, Couce ML. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research , Diagnosis and

- Treatment. *Curr Med Chem.* 2018;25(3):404-432. doi:10.2174/0929867324666170718101946
117. Yao R, Zhang C, Yu T, et al. Evaluation of three read-depth based CNV detection tools using whole-exome sequencing data. *Mol Cytogenet.* 2017;10:30. doi:10.1186/s13039-017-0333-5
118. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010;42(1):30-35. doi:10.1038/ng.499
119. Trujillano D, Bertoli-Avella AM, Kumar Kandaswamy K, et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):176-182. doi:10.1038/ejhg.2016.146
120. Posey JE, Harel T, Liu P, et al. Resolution of Disease Phenotypes Resulting from Multilocus Genomic Variation. *New England Journal of Medicine.* 2017;376(1):21-31. doi:10.1056/NEJMoa1516767
121. Melbourne Genomics Health Alliance, Stark Z, Tan TY, et al. A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet Med.* 2016;18(11):1090-1096. doi:10.1038/gim.2016.1
122. Evers C, Stauffer C, Granzow M, et al. Impact of clinical exomes in neurodevelopmental and neurometabolic disorders. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2017;121(4):297-307. doi:10.1016/j.ymgme.2017.06.014
123. Wang W, Corominas R, Lin GN. De novo Mutations From Whole Exome Sequencing in Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders: From Discovery to Application. *Front Genet.* 2019;10. doi:10.3389/fgene.2019.00258
124. Lionel AC, Costain G, Monfared N, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med.* 2018;20(4):435-443. doi:10.1038/gim.2017.119

125. Hiatt SM, Amaral MD, Bowling KM, et al. Systematic reanalysis of genomic data improves quality of variant interpretation. *Clin Genet.* 2018;94(1):174-178. doi:10.1111/cge.13259
126. Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. *NPJ Genom Med.* 2018;3:10. doi:10.1038/s41525-018-0049-4
127. Meng L, Pammi M, Saronwala A, et al. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr.* 2017;171(12):e173438. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.3438
128. Mestek-Boukhibar L, Clement E, Jones WD, et al. Rapid Paediatric Sequencing (RaPS): comprehensive real-life workflow for rapid diagnosis of critically ill children. *J Med Genet.* 2018;55(11):721-728. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105396
129. Petrikin JE, Cakici JA, Clark MM, et al. The NSIGHT1-randomized controlled trial: rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants. *NPJ Genom Med.* 2018;3. doi:10.1038/s41525-018-0045-8
130. Stark Z, Lunke S, Brett GR, et al. Meeting the challenges of implementing rapid genomic testing in acute pediatric care. *Genet Med.* 2018;20(12):1554-1563. doi:10.1038/gim.2018.37
131. Rodenburg RJ. The functional genomics laboratory: functional validation of genetic variants. *J Inherit Metab Dis.* 2018;41(3):297-307. doi:10.1007/s10545-018-0146-7
132. Ceyhan-Birsoy O, Murry JB, Machini K, et al. Interpretation of Genomic Sequencing Results in Healthy and Ill Newborns: Results from the BabySeq Project. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):76-93. doi:10.1016/j.ajhg.2018.11.016
133. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genet Med.* 2013;15(7):565-574. doi:10.1038/gim.2013.73

134. Jamuar SS, Tan E-C. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Hum Genomics*. 2015;9(1). doi:10.1186/s40246-015-0031-5
135. Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(8):565-575. doi:10.1038/nrg3241
136. Panza E, Escamilla-Honrubia JM, Marco-Marín C, et al. ALDH18A1 gene mutations cause dominant spastic paraplegia SPG9: loss of function effect and plausibility of a dominant negative mechanism. *Brain*. 2016;139(Pt 1):e3. doi:10.1093/brain/awv247
137. Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr Genomics*. 2011;12(4):238-249. doi:10.2174/138920211795860107
138. Spataro N, Rodríguez JA, Navarro A, Bosch E. Properties of human disease genes and the role of genes linked to Mendelian disorders in complex disease aetiology. *Hum Mol Genet*. 2017;26(3):489-500. doi:10.1093/hmg/ddw405
139. Marian AJ. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res*. 2012;159(2):64-79. doi:10.1016/j.trsl.2011.08.001
140. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*. 2012;90(1):7-24. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.029
141. Day-Williams AG, Zeggini E. The effect of next-generation sequencing technology on complex trait research. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(5):561-567. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02437.x
142. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics*. 2020;28(2):165-173. doi:10.1038/s41431-019-0508-0
143. Liu Z, Zhu L, Roberts R, Tong W. Toward Clinical Implementation of Next-Generation Sequencing-Based Genetic Testing in Rare Diseases: Where Are We? *Trends in Genetics*. 2019;35(11):852-867. doi:10.1016/j.tig.2019.08.006

144. Danese E, Lippi G. Rare diseases: the paradox of an emerging challenge. *Ann Transl Med.* 2018;6(17). doi:10.21037/atm.2018.09.04
145. Li C-K. New trend in the epidemiology of thalassaemia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;39:16-26. doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.10.013
146. DeWeerd S. Genetics: Clues in the code. *Nature.* 2016;540(7634):S104-S105. doi:10.1038/540S104a
147. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med.* 2011;13(3):255-262. doi:10.1097/GIM.0b013e3182088158
148. Agana M, Frueh J, Kamboj M, Patel DR, Kanungo S. Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice. *Ann Transl Med.* 2018;6(24). doi:10.21037/atm.2018.12.34
149. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. 1902. *Mol Med.* 1996;2(3):274-282.
150. Waters D, Adeloye D, Woolham D, Wastnedge E, Patel S, Rudan I. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *J Glob Health.* 8(2). doi:10.7189/jogh.08.021102
151. Levy PA. Inborn errors of metabolism: part 1: overview. *Pediatr Rev.* 2009;30(4):131-137; quiz 137-138. doi:10.1542/pir.30-4-131
152. Ferreira CR, van Karnebeek CDM, Vockley J, Blau N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med.* 2019;21(1):102-106. doi:10.1038/s41436-018-0022-8
153. Verity C, Winstone AM, Stellitano L, Will R, Nicoll A. The epidemiology of progressive intellectual and neurological deterioration in childhood. *Arch Dis Child.* 2010;95(5):361-364. doi:10.1136/adc.2009.173419

154. Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, et al. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain*. 2013;136(Pt 10):3106-3118. doi:10.1093/brain/awt236
155. Arnoux J-B, Verkarre V, Saint-Martin C, et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:63. doi:10.1186/1750-1172-6-63
156. Proverbio MC, Mangano E, Gessi A, et al. Whole Genome SNP Genotyping and Exome Sequencing Reveal Novel Genetic Variants and Putative Causative Genes in Congenital Hyperinsulinism. *PLoS One*. 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0068740
157. Sanyoura M, Philipson LH, Naylor R. Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options. *Curr Diab Rep*. 2018;18(8):58. doi:10.1007/s11892-018-1024-2
158. De León DD, Stanley CA. Permanent Neonatal Diabetes Mellitus. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed March 23, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1447/>
159. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(4):200-213. doi:10.1038/ncpendmet0778
160. Naylor RN, Greeley SAW, Bell GI, Philipson LH. Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*. 2011;2(3):158-169. doi:10.1111/j.2040-1124.2011.00106.x
161. Dupont J, Pereira C, Medeira A, Duarte R, Ellard S, Sampaio L. Permanent neonatal diabetes mellitus due to KCNJ11 mutation in a Portuguese family: transition from insulin to oral sulfonylureas. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25(3-4):367-370. doi:10.1515/jpem-2011-0191
162. van Hasselt PM, Clayton PT, Houwen RHJ. Disorders in the Transport of Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Selenium and Zinc. In: Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter J, eds. *Inborn Metabolic*

- Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer; 2016:531-548. doi:10.1007/978-3-662-49771-5_37
163. García-Cazorla À, Saudubray J-M. Cellular neurometabolism: a tentative to connect cell biology and metabolism in neurology. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(6):1043-1054. doi:10.1007/s10545-018-0226-8
164. Tarlungeanu DC, Deliu E, Dotter CP, et al. Impaired amino acid transport at the blood brain barrier is a cause of autism spectrum disorder. *Cell*. 2016;167(6):1481-1494.e18. doi:10.1016/j.cell.2016.11.013
165. Guemez-Gamboa A, Nguyen LN, Yang H, et al. Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome. *Nat Genet*. 2015;47(7):809-813. doi:10.1038/ng.3311
166. Novarino G, El-Fishawy P, Kayserili H, et al. Mutations in BCKD-kinase lead to a potentially treatable form of autism with epilepsy. *Science*. 2012;338(6105):394-397. doi:10.1126/science.1224631
167. Frazier AE, Thorburn DR, Compton AG. Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J Biol Chem*. 2019;294(14):5386-5395. doi:10.1074/jbc.R117.809194
168. Rahman S, Mayr JA. Disorders of Oxidative Phosphorylation. In: Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter J, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer; 2016:223-242. doi:10.1007/978-3-662-49771-5_14
169. De Meirleir LJ, Van Coster R, Lissens W. Disorders of Pyruvate Metabolism and the Tricarboxylic Acid Cycle. In: Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G, Walter JH, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer; 2006:161-174. doi:10.1007/978-3-540-28785-8_12
170. Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol*. 2010;33(4):589-604. doi:10.1590/S1415-47572010005000093

171. Vanier MT, Caillaud C, Levade T. Disorders of Sphingolipid Synthesis, Sphingolipidoses, Niemann-Pick Disease Type C and Neuronal Ceroid Lipofuscinoses. In: Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter J, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer; 2016:551-575. doi:10.1007/978-3-662-49771-5_38
172. Waugh MG. PIPs in neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(8):1066-1082. doi:10.1016/j.bbaliip.2015.02.002
173. Waterham HR, Clayton PT. Disorders of Isoprenoid/Cholesterol Synthesis. In: Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter J, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer; 2016:455-464. doi:10.1007/978-3-662-49771-5_32
174. Saudubray J-M, Garcia-Cazorla À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am*. 2018;65(2):179-208. doi:10.1016/j.pcl.2017.11.002
175. Wanders RJA, Aubourg P, Poll-The BT. Inborn Errors of Non-Mitochondrial Fatty Acid Metabolism Including Peroxisomal Disorders. In: Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter J, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer; 2016:591-606. doi:10.1007/978-3-662-49771-5_40
176. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. *Handb Clin Neurol*. 2013;113:1737-1743. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00044-7
177. Tokarev AA, Alfonso A, Segev N. *Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways*. Landes Bioscience; 2013. Accessed March 24, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7286/>
178. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2017;88(3):296-303. doi:10.1212/WNL.0000000000003509
179. Lennox WG. The genetics of epilepsy. *Am J Psychiatry*. 1947;103(4):457-462. doi:10.1176/ajp.103.4.457

180. Kjeldsen MJ, Kyvik KO, Christensen K, Friis ML. Genetic and environmental factors in epilepsy: a population-based study of 11900 Danish twin pairs. *Epilepsy Res.* 2001;44(2-3):167-178. doi:10.1016/s0920-1211(01)00196-6
181. Sillanpää M, Koskenvuo M, Romanov K, Kaprio J. Genetic factors in epileptic seizures: evidence from a large twin population. *Acta Neurol Scand.* 1991;84(6):523-526. doi:10.1111/j.1600-0404.1991.tb05886.x
182. Klassen T, Davis C, Goldman A, et al. Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell.* 2011;145(7):1036-1048. doi:10.1016/j.cell.2011.05.025
183. Epi4K Consortium. Phenotypic analysis of 303 multiplex families with common epilepsies. *Brain.* 2017;140(8):2144-2156. doi:10.1093/brain/awx129
184. Kinirons P, Rabinowitz D, Gravel M, et al. Phenotypic concordance in 70 families with IGE-implications for genetic studies of epilepsy. *Epilepsy Res.* 2008;82(1):21-28. doi:10.1016/j.epilepsyres.2008.06.011
185. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, et al. Mutations of SCN1A , encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nature Genetics.* 2000;24(4):343-345. doi:10.1038/74159
186. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 1995;11(2):201-203. doi:10.1038/ng1095-201
187. Charlier C, Singh NA, Ryan SG, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet.* 1998;18(1):53-55. doi:10.1038/ng0198-53
188. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet.* 1998;18(1):25-29. doi:10.1038/ng0198-25

189. Heron SE, Crossland KM, Andermann E, et al. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet*. 2002;360(9336):851-852. doi:10.1016/S0140-6736(02)09968-3
190. Wirrell E, Farrell K, Whiting S. The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Can J Neurol Sci*. 2005;32(4):409-418. doi:10.1017/s0317167100004388
191. Hamiwka LD, Wirrell EC. Comorbidities in pediatric epilepsy: beyond "just" treating the seizures. *J Child Neurol*. 2009;24(6):734-742. doi:10.1177/0883073808329527
192. Nemos C, Lambert L, Giuliano F, et al. Mutational spectrum of CDKL5 in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature. *Clinical Genetics*. 2009;76(4):357-371. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01194.x
193. Poirier K, Abriol J, Souville I, et al. Maternal mosaicism for mutations in the ARX gene in a family with X linked mental retardation. *Hum Genet*. 2005;118(1):45-48. doi:10.1007/s00439-005-0011-2
194. Appenzeller S, Balling R, Barisic N, et al. De Novo Mutations in Synaptic Transmission Genes Including DNMI Cause Epileptic Encephalopathies. *The American Journal of Human Genetics*. 2014;95(4):360-370. doi:10.1016/j.ajhg.2014.08.013
195. Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends Neurosci*. 2008;31(3):154-162. doi:10.1016/j.tins.2007.12.004
196. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*. 1993;364(6439):717-721. doi:10.1038/364717a0
197. des Portes V, Francis F, Pinard JM, et al. doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet*. 1998;7(7):1063-1070. doi:10.1093/hmg/7.7.1063

198. Kato M, Das S, Petras K, et al. Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 2004;23(2):147-159. doi:10.1002/humu.10310
199. Hong SE, Shugart YY, Huang DT, et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet.* 2000;26(1):93-96. doi:10.1038/79246
200. Rivière J-B, van Bon BWM, Hoischen A, et al. De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(4):440-S2. doi:10.1038/ng.1091
201. Magen D, Ofir A, Berger L, et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with a loss-of-function mutation in CDK5. *Hum Genet.* 2015;134(3):305-314. doi:10.1007/s00439-014-1522-5
202. Bahi-Buisson N, Poirier K, Fourniol F, et al. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain.* 2014;137(Pt 6):1676-1700. doi:10.1093/brain/awu082
203. Keays DA, Tian G, Poirier K, et al. Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell.* 2007;128(1):45-57. doi:10.1016/j.cell.2006.12.017
204. Beange H, Taplin JE. Prevalence of intellectual disability in northern Sydney adults. *J Intellect Disabil Res.* 1996;40 (Pt 3):191-197. doi:10.1046/j.1365-2788.1996.769769.x
205. Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F1000Res.* 2016;5. doi:10.12688/f1000research.7134.1
206. Leonard H, Petterson B, Bower C, Sanders R. Prevalence of intellectual disability in Western Australia. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2003;17(1):58-67. doi:10.1046/j.1365-3016.2003.00469.x
207. Definition: intellectual disability. doi:<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/news/news/2010/15/childrens-right-to-family-life/definition-intellectual-disability>

208. Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, et al. *Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports. Eleventh Edition*. American Association on Intellectual and Developmental Disabilities; 2010.
209. Hu H, Haas SA, Chelly J, et al. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry*. 2016;21(1):133-148. doi:10.1038/mp.2014.193
210. Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):579-590. doi:10.1016/j.ajhg.2012.02.018
211. Maddirevula S, Anazi S, Salpietro V, et al. Expanding the genetic heterogeneity of intellectual disability. *Hum Genet*. 2017;136(11-12):1419-1429. doi:10.1007/s00439-017-1843-2
212. 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;140(19):2063-2074. doi:10.1002/ajmg.a.31416
213. Laing NG. Genetics of neuromuscular disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012;49(2):33-48. doi:10.3109/10408363.2012.658906
214. Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *J Med Genet*. 1981;18(6):442-447. doi:10.1136/jmg.18.6.442
215. Zatz M, Passos-Bueno MR, Vainzof M. Neuromuscular disorders: genes, genetic counseling and therapeutic trials. *Genet Mol Biol*. 2016;39(3):339-348. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0019
216. Hedera P. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed March 24, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>

217. Cordeiro D, Bullivant G, Siriwardena K, et al. Genetic landscape of pediatric movement disorders and management implications. *Neurol Genet.* 2018;4(5):e265. doi:10.1212/NXG.0000000000000265
218. Sanger TD, Chen D, Fehlings DL, et al. Definition and classification of hyperkinetic movements in childhood. *Mov Disord.* 2010;25(11):1538-1549. doi:10.1002/mds.23088
219. Garcia-Cazorla A, Duarte ST. Parkinsonism and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(4):627-642. doi:10.1007/s10545-014-9723-6
220. Ozelius L, Lubarr N. DYT1 Early-Onset Isolated Dystonia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed March 24, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1492/>
221. Chen W-J, Lin Y, Xiong Z-Q, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nature Genetics.* 2011;43(12):1252-1255. doi:10.1038/ng.1008
222. Jarman PR, Wood NW. Genetics of movement disorders and ataxia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2002;73(suppl 2):ii22-ii26. doi:10.1136/jnnp.73.suppl_2.ii22
223. Oud MM, Lamers IJC, Arts HH. Ciliopathies: Genetics in Pediatric Medicine. *J Pediatr Genet.* 2017;6(1):18-29. doi:10.1055/s-0036-1593841
224. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet.* 2015;97(2):199-215. doi:10.1016/j.ajhg.2015.06.009
225. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics.* 2009;25(17):2283-2285. doi:10.1093/bioinformatics/btp373

226. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(9):e67-e67. doi:10.1093/nar/gkp215
227. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2015;31(5):761-763. doi:10.1093/bioinformatics/btu703
228. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-576. doi:10.1038/nmeth0810-575
229. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(12):e1001025. doi:10.1371/journal.pcbi.1001025
230. Chromas | Technelysium Pty Ltd. Accessed April 24, 2020. <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>
231. Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Müller T, Neudecker S, Zier S. Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2002;1556(1):41-52. doi:10.1016/S0005-2728(02)00305-5
232. Lemire BD. Evolution of FOXRED1, an FAD-dependent oxidoreductase necessary for NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847(4-5):451-457. doi:10.1016/j.bbabi.2015.01.014
233. Formosa LE, Mimaki M, Frazier AE, et al. Characterization of mitochondrial FOXRED1 in the assembly of respiratory chain complex I. *Hum Mol Genet*. 2015;24(10):2952-2965. doi:10.1093/hmg/ddv058
234. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:421. doi:10.1186/1471-2105-10-421

235. Remmert M, Biegert A, Hauser A, Söding J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods*. 2011;9(2):173-175. doi:10.1038/nmeth.1818
236. Abadie V, Lyonnet S, Maurin N, et al. CpG dinucleotides are mutation hot spots in phenylketonuria. *Genomics*. 1989;5(4):936-939. doi:10.1016/0888-7543(89)90137-7
237. Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. *J Hum Genet*. 2008;53(5):407-418. doi:10.1007/s10038-008-0264-4
238. Trunzo R, Santacroce R, D'Andrea G, et al. Mutation analysis in hyperphenylalaninemia patients from South Italy. *Clin Biochem*. 2013;46(18):1896-1898. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.06.009
239. Van Hove JL, Kishnani PS, Demaerel P, et al. Acute hydrocephalus in nonketotic hyperglycinemia. *Neurology*. 2000;54(3):754-756. doi:10.1212/wnl.54.3.754
240. Bravo-Alonso I, Navarrete R, Arribas-Carreira L, et al. Nonketotic hyperglycinemia: Functional assessment of missense variants in GLDC to understand phenotypes of the disease. *Hum Mutat*. 2017;38(6):678-691. doi:10.1002/humu.23208
241. Peretz H, Naamati MS, Levartovsky D, et al. Identification and characterization of the first mutation (Arg776Cys) in the C-terminal domain of the Human Molybdenum Cofactor Sulfurase (HMCS) associated with type II classical xanthinuria. *Mol Genet Metab*. 2007;91(1):23-29. doi:10.1016/j.ymgme.2007.02.005
242. Zhou Y, Zhang X, Ding R, et al. Using Next-Generation Sequencing to Identify a Mutation in Human MCSU that is Responsible for Type II Xanthinuria. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2412-2421. doi:10.1159/000374042
243. Mokhtariye A, Hagh-Nazari L, Varasteh A-R, Keyfi F. Diagnostic methods for Lysosomal Storage Disease. *Rep Biochem Mol Biol*. 2019;7(2):119-128.

244. Koenig MK. Presentation and Diagnosis of Mitochondrial Disorders in Children. *Pediatr Neurol.* 2008;38(5):305-313. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.001
245. Di Rosa G, Deodato F, Loupatty FJ, et al. Hypertrophic cardiomyopathy, cataract, developmental delay, lactic acidosis: a novel subtype of 3-methylglutaconic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(4):546-550. doi:10.1007/s10545-006-0279-y
246. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(118):118ra10. doi:10.1126/scitranslmed.3003310
247. Inherited Metabolic Disorders: Overview, Clinical Features and Differential Diagnosis, Epidemiology and Statistics. Published online November 9, 2019. Accessed June 14, 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/1183253-overview>
248. Brea-Calvo G, Haack TB, Karall D, et al. COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *Am J Hum Genet.* 2015;96(2):309-317. doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.023
249. Saudubray J-M, Garcia-Cazorla A. An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders. *Dialogues Clin Neurosci.* 2018;20(4):301-325.
250. Zschocke J. Dominant versus recessive: molecular mechanisms in metabolic disease. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31(5):599-618. doi:10.1007/s10545-008-1016-5
251. Pitts KR, McNiven MA, Yoon Y. Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50286-50294. doi:10.1074/jbc.M405531200
252. Waterham HR, Koster J, van Roermund CWT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and

- peroxisomal fission. *N Engl J Med.* 2007;356(17):1736-1741. doi:10.1056/NEJMoa064436
253. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, et al. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain.* 2010;133(Pt 3):771-786. doi:10.1093/brain/awq007
254. Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science.* 1999;284(5418):1372-1376. doi:10.1126/science.284.5418.1372
255. Leroy JG, Seppala R, Huizing M, et al. Dominant inheritance of sialuria, an inborn error of feedback inhibition. *Am J Hum Genet.* 2001;68(6):1419-1427. doi:10.1086/320598
256. Keebaugh AC, Sullivan RT, NISC Comparative Sequencing Program, Thomas JW. Gene duplication and inactivation in the HPRT gene family. *Genomics.* 2007;89(1):134-142. doi:10.1016/j.ygeno.2006.07.003
257. Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40128-40135. doi:10.1074/jbc.M300909200
258. Maranduba CMC, Friesema ECH, Kok F, et al. Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *J Med Genet.* 2006;43(5):457-460. doi:10.1136/jmg.2005.035840
259. Kanungo S, Morton J, Neelakantan M, Ching K, Saedian J, Goldstein A. Mitochondrial disorders. *Ann Transl Med.* 2018;6(24). doi:10.21037/atm.2018.12.13
260. De Meirleir L, Specola N, Seneca S, Lissens W. Pyruvate dehydrogenase E1 alpha deficiency in a family: different clinical presentation in two siblings. *J Inherit Metab Dis.* 1998;21(3):224-226. doi:10.1023/a:1005347501111

261. Roach JC, Glusman G, Smit AFA, et al. Analysis of Genetic Inheritance in a Family Quartet by Whole Genome Sequencing. *Science*. 2010;328(5978):636-639. doi:10.1126/science.1186802
262. Acuna-Hidalgo R, Veltman JA, Hoischen A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol*. 2016;17(1):241. doi:10.1186/s13059-016-1110-1
263. Lupski JR. Structural Variation Mutagenesis of the Human Genome: Impact on Disease and Evolution. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(5):419-436. doi:10.1002/em.21943
264. de Ligt J, Veltman JA, Vissers LELM. Point mutations as a source of de novo genetic disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23(3):257-263. doi:10.1016/j.gde.2013.01.007
265. Goldmann JM, Wong WSW, Pinelli M, et al. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat Genet*. 2016;48(8):935-939. doi:10.1038/ng.3597
266. McRae JF, Clayton S, Fitzgerald TW, et al. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature*. 2017;542(7642):433-438. doi:10.1038/nature21062
267. Heyne HO, Singh T, Stamberger H, et al. De novo variants in neurodevelopmental disorders with epilepsy. *Nature Genetics*. 2018;50(7):1048-1053. doi:10.1038/s41588-018-0143-7
268. Epi4K Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen AS, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501(7466):217-221. doi:10.1038/nature12439
269. Hiraide T, Kaba Yasui H, Kato M, Nakashima M, Saitsu H. A de novo variant in RAC3 causes severe global developmental delay and a middle interhemispheric variant of holoprosencephaly. *Journal of Human Genetics*. 2019;64(11):1127-1132. doi:10.1038/s10038-019-0656-7
270. Rodan LH, El Achkar CM, Berry GT, et al. De Novo TUBB2A Variant Presenting With Anterior Temporal Pachygyria. *J Child Neurol*. 2017;32(1):127-131. doi:10.1177/0883073816672998

271. Horn S, Au M, Basel-Salmon L, et al. De novo variants in PAK1 lead to intellectual disability with macrocephaly and seizures. *Brain*. 2019;142(11):3351-3359. doi:10.1093/brain/awz264
272. Madeo M, Stewart M, Sun Y, et al. Loss-of-Function Mutations in FRRS1L Lead to an Epileptic-Dyskinetic Encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1249-1255. doi:10.1016/j.ajhg.2016.04.008
273. Han C, Alkhatir R, Froukh T, et al. Epileptic Encephalopathy Caused by Mutations in the Guanine Nucleotide Exchange Factor DENND5A. *Am J Hum Genet*. 2016;99(6):1359-1367. doi:10.1016/j.ajhg.2016.10.006
274. Koch J, Mayr JA, Alhaddad B, et al. CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy. *Brain*. 2017;140(2):279-286. doi:10.1093/brain/aww300
275. Ait-El-Mkadem S, Dayem-Quere M, Gusic M, et al. Mutations in MDH2, Encoding a Krebs Cycle Enzyme, Cause Early-Onset Severe Encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 2017;100(1):151-159. doi:10.1016/j.ajhg.2016.11.014
276. Hardies K, Cai Y, Jardel C, et al. Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain*. 2016;139(Pt 9):2420-2430. doi:10.1093/brain/aww180
277. Siekierska A, Isrie M, Liu Y, et al. Gain-of-function *FHFI* mutation causes early-onset epileptic encephalopathy with cerebellar atrophy. *Neurology*. 2016;86(23):2162-2170. doi:10.1212/WNL.0000000000002752
278. Colin E, Daniel J, Ziegler A, et al. Biallelic Variants in UBA5 Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(3):695-703. doi:10.1016/j.ajhg.2016.06.030
279. Epi4K Consortium. De Novo Mutations in SLC1A2 and CACNA1A Are Important Causes of Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet*. 2016;99(2):287-298. doi:10.1016/j.ajhg.2016.06.003

280. Allen NM, Conroy J, Shahwan A, et al. Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*. 2016;57(1):e12-e17. doi:10.1111/epi.13250
281. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):397-409. doi:10.1124/pr.57.4.4
282. Cossette P. Channelopathies and juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*. 2010;51(s1):30-32. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02439.x
283. Werner F-M, Coveñas R. Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy: a focus on antiepileptic drugs. *Curr Med Chem*. 2011;18(32):4933-4948. doi:10.2174/092986711797535191
284. Kothur K, Holman K, Farnsworth E, et al. Diagnostic yield of targeted massively parallel sequencing in children with epileptic encephalopathy. *Seizure*. 2018;59:132-140. doi:10.1016/j.seizure.2018.05.005
285. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Am J Hum Genet*. 2001;68(6):1327-1332.
286. Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, et al. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *The American Journal of Human Genetics*. 2017;101(5):664-685. doi:10.1016/j.ajhg.2017.09.008
287. Jang SS, Kim SY, Kim H, et al. Diagnostic Yield of Epilepsy Panel Testing in Patients With Seizure Onset Within the First Year of Life. *Front Neurol*. 2019;10. doi:10.3389/fneur.2019.00988
288. Oates S, Tang S, Rosch R, et al. Incorporating epilepsy genetics into clinical practice: a 360°evaluation. *npj Genomic Medicine*. 2018;3(1):1-11. doi:10.1038/s41525-018-0052-9

289. Mirzaa GM, Paciorkowski AR. Introduction: Brain malformations. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2014;166(2):117-123. doi:10.1002/ajmg.c.31404
290. Tan AP, Chong WK, Mankad K. Comprehensive genotype-phenotype correlation in lissencephaly. *Quant Imaging Med Surg*. 2018;8(7):673-693. doi:10.21037/qims.2018.08.08
291. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics*. 2015;8(Suppl 1):S4. doi:10.1186/1755-8794-8-S1-S4
292. Pavone P, Praticò AD, Rizzo R, et al. A clinical review on megalencephaly. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(26). doi:10.1097/MD.0000000000006814
293. Mandel S, Rechavi G, Gozes I. Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) differentially interacts with chromatin to regulate genes essential for embryogenesis. *Dev Biol*. 2007;303(2):814-824. doi:10.1016/j.ydbio.2006.11.039
294. Beecroft SJ, Yau KS, Allcock RJN, et al. Targeted gene panel use in 2249 neuromuscular patients: the Australasian referral center experience. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2020;7(3):353-362. doi:10.1002/acn3.51002
295. Qin H, Kemp J, Yip MY, Lam-Po-Tang PR, Hoh JF, Morris BJ. Localization of human cardiac beta-myosin heavy chain gene (MYH7) to chromosome 14q12 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1990;54(1-2):74-76. doi:10.1159/000132961
296. Helbig KL, Farwell Hagman KD, Shinde DN, et al. Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genetics in Medicine*. 2016;18(9):898-905. doi:10.1038/gim.2015.186
297. Papuc SM, Abela L, Steindl K, et al. The role of recessive inheritance in early-onset epileptic encephalopathies: a combined whole-exome sequencing and copy number study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;27(3):408-421. doi:10.1038/s41431-018-0299-8

298. Krenn M, Tomschik M, Rath J, et al. Genotype-guided diagnostic reassessment after exome sequencing in neuromuscular disorders: experiences with a two-step approach. *Eur J Neurol.* 2020;27(1):51-61. doi:10.1111/ene.14033
299. Fernández-Marmiesse A, Carrascosa-Romero MC, Alfaro Ponce B, et al. Homozygous truncating mutation in prenatally expressed skeletal isoform of TTN gene results in arthrogryposis multiplex congenita and myopathy without cardiac involvement. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(2):188-192. doi:10.1016/j.nmd.2016.11.002
300. Wheway G, Consortium GER, Mitchison HM, et al. Opportunities and Challenges for Molecular Understanding of Ciliopathies–The 100,000 Genomes Project. *Front Genet.* 2019;10. doi:10.3389/fgene.2019.00127
301. Tărlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Exp Mol Med.* 2018;50(8). doi:10.1038/s12276-018-0129-7
302. Olson HE, Demarest ST, Pestana-Knight EM, et al. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatric Neurology.* 2019;97:18-25. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2019.02.015
303. Balciuniene J, DeChene ET, Akgumus G, et al. Use of a Dynamic Genetic Testing Approach for Childhood-Onset Epilepsy. *JAMA Netw Open.* 2019;2(4). doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.2129
304. Swanberg SE, Nagarajan RP, Peddada S, Yasui DH, LaSalle JM. Reciprocal co-regulation of EGR2 and MECP2 is disrupted in Rett syndrome and autism. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):525-534. doi:10.1093/hmg/ddn380
305. Palmer EE, Stuhlmann T, Weinert S, et al. De novo and inherited mutations in the X-linked gene CLCN4 are associated with syndromic intellectual disability and behavior and seizure disorders in males and females. *Mol Psychiatry.* 2018;23(2):222-230. doi:10.1038/mp.2016.135
306. Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T, Reiner O. Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol*

- Genet.* 2000; 9(15):2205-2213.
doi:10.1093/oxfordjournals.hmg.a018911
307. Takumi T, Tamada K. CNV biology in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol.* 2018;48:183-192.
doi:10.1016/j.conb.2017.12.004
308. Wilfert AB, Sulovari A, Turner TN, Coe BP, Eichler EE. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome Med.* 2017;9(1):101.
doi:10.1186/s13073-017-0498-x
309. Alkuraya FS. Natural human knockouts and the era of genotype to phenotype. *Genome Medicine.* 2015;7(1):48. doi:10.1186/s13073-015-0173-z
310. Boone PM, Campbell IM, Baggett BC, et al. Deletions of recessive disease genes: CNV contribution to carrier states and disease-causing alleles. *Genome Res.* 2013;23(9):1383-1394.
doi:10.1101/gr.156075.113
311. Kremer LS, Distelmaier F, Alhaddad B, et al. Bi-allelic Truncating Mutations in TANGO2 Cause Infancy-Onset Recurrent Metabolic Crises with Encephalomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2016;98(2):358-362. doi:10.1016/j.ajhg.2015.12.009
312. Kloosterman WP, Francioli LC, Hormozdiari F, et al. Characteristics of de novo structural changes in the human genome. *Genome Res.* 2015;25(6):792-801. doi:10.1101/gr.185041.114
313. Harel T, Yoon WH, Garone C, et al. Recurrent De Novo and Biallelic Variation of ATAD3A, Encoding a Mitochondrial Membrane Protein, Results in Distinct Neurological Syndromes. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):831-845. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.007
314. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, et al. Recent segmental duplications in the human genome. *Science.* 2002;297(5583):1003-1007.
doi:10.1126/science.1072047
315. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the

- human genome. *Nat Genet.* 2006;38(9):1038-1042. doi:10.1038/ng1862
316. Duyzend MH, Nettle X, Coe BP, et al. Maternal Modifiers and Parent-of-Origin Bias of the Autism-Associated 16p11.2 CNV. *Am J Hum Genet.* 2016;98(1):45-57. doi:10.1016/j.ajhg.2015.11.017
317. Møller RS, Weber YG, Klitten LL, et al. Exon-disrupting deletions of NRXN1 in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(2):256-264. doi:10.1111/epi.12078
318. Lal D, Ruppert A-K, Trucks H, et al. Burden analysis of rare microdeletions suggests a strong impact of neurodevelopmental genes in genetic generalised epilepsies. *PLoS Genet.* 2015;11(5):e1005226. doi:10.1371/journal.pgen.1005226
319. Lal D, Trucks H, Møller RS, et al. Rare exonic deletions of the RBFOX1 gene increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(2):265-271. doi:10.1111/epi.12084
320. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet.* 2009;41(2):160-162. doi:10.1038/ng.292
321. Fry AE, Rees E, Thompson R, et al. Pathogenic copy number variants and SCN1A mutations in patients with intellectual disability and childhood-onset epilepsy. *BMC Med Genet.* 2016;17. doi:10.1186/s12881-016-0294-2
322. Dinopoulos A, Stefanou M-I, Attilakos A, Tsirouda M, Papaevangelou V. A case of startle epilepsy associated with IL1RAPL1 gene deletion. *Pediatr Neurol.* 2014;51(2):271-274. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.04.011
323. Gu W, Lupski JR. CNV and nervous system diseases – what’s new? *Cytogenet Genome Res.* 2009;123(1-4):54-64. doi:10.1159/000184692
324. Duarte AJ, Ribeiro D, Oliveira P, Amaral O. Mutation Frequency of Three Neurodegenerative Lysosomal Storage Diseases: From Screening to Treatment? *Arch Med Res.* 2017;48(3):263-269. doi:10.1016/j.arcmed.2017.04.001

325. Ohno K, Saito S, Sugawara K, Sakuraba H. Structural consequences of amino acid substitutions causing Tay-Sachs disease. *Mol Genet Metab.* 2008;94(4):462-468. doi:10.1016/j.ymgme.2008.04.006
326. dos Santos MR, Tanaka A, Sá Miranda MC, Ribeiro MG, Maia M, Suzuki K. GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of beta-hexosaminidase alpha gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am J Hum Genet.* 1991;49(4):886-890.
327. Gort L, de Olano N, Macías-Vidal J, Coll MAJ, Spanish GM2 Working Group. GM2 gangliosidosis in Spain: analysis of the HEXA and HEXB genes in 34 Tay-Sachs and 14 Sandhoff patients. *Gene.* 2012;506(1):25-30. doi:10.1016/j.gene.2012.06.080
328. Whitley CB, Anderson RA, McIvor RS. Heterozygosity for the “DN allele” (G533-greater than A) of the beta-hexosaminidase alpha subunit gene identified by direct DNA sequencing in a family with the B1 variant of GM2-gangliosidosis. *Neuropediatrics.* 1992;23(2):96-101. doi:10.1055/s-2008-1071320
329. Rastegar Moghadam M, Shojaei A, Babaei V, Rohani F, Ghazi F. Mutation analysis of Phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with Phenylketonuria. *Med J Islam Repub Iran.* 2018;32:21. doi:10.14196/mjiri.32.21
330. Staudigl M, Gersting SW, Danecka MK, et al. The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Hum Mol Genet.* 2011;20(13):2628-2641. doi:10.1093/hmg/ddr165
331. BIOPKU :: International Database of Patients and Mutations causing BH4-responsive HPA/PKU. Accessed May 13, 2020. <http://www.biopku.org/pah/home.asp>
332. Gundorova P, Stepanova AA, Kuznetsova IA, Kutsev SI, Polyakov AV. Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia. *PLoS One.* 2019;14(1). doi:10.1371/journal.pone.0211048
333. Danecka MK, Woidy M, Zschocke J, Feillet F, Muntau AC, Gersting SW. Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine

- hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria. *J Med Genet.* 2015;52(3):175-185. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102621
334. Mirzaa G. MPPH Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed May 13, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK396098/>
335. Terrone G, Voisin N, Abdullah Alfaiz A, et al. De novo PIK3R2 variant causes polymicrogyria, corpus callosum hyperplasia and focal cortical dysplasia. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(9):1359-1362. doi:10.1038/ejhg.2016.7
336. Rivière J-B, Mirzaa GM, O’Roak BJ, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet.* 2012;44(8):934-940. doi:10.1038/ng.2331
337. Lee Y-C, Lee M-J, Yu H-Y, et al. PRRT2 mutations in paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions in a Taiwanese cohort. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e38543. doi:10.1371/journal.pone.0038543
338. Méneret A, Grabli D, Depienne C, et al. PRRT2 mutations: a major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology.* 2012;79(2):170-174. doi:10.1212/WNL.0b013e31825f06c3
339. Schubert J, Paravidino R, Becker F, et al. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Hum Mutat.* 2012;33(10):1439-1443. doi:10.1002/humu.22126
340. Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Westenberger A, Klein C. The evolving spectrum of PRRT2-associated paroxysmal diseases. *Brain.* 2015;138(Pt 12):3476-3495. doi:10.1093/brain/awv317
341. Ebrahimi-Fakhari D, Moufawad El Achkar C, Klein C. PRRT2-Associated Paroxysmal Movement Disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews®*. University of Washington,

- Seattle; 1993. Accessed May 13, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK475803/>
342. Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science*. 1994;264(5165):1604-1608. doi:10.1126/science.8202715
343. Loewen CJR, Moritz OL, Molday RS. Molecular Characterization of Peripherin-2 and Rom-1 Mutants Responsible for Digenic Retinitis Pigmentosa. *J Biol Chem*. 2001;276(25):22388-22396. doi:10.1074/jbc.M011710200
344. Deltas C. Digenic inheritance and genetic modifiers. *Clin Genet*. 2018;93(3):429-438. doi:10.1111/cge.13150
345. Rachel RA, May-Simera HL, Veleri S, et al. Combining Cep290 and Mkks ciliopathy alleles in mice rescues sensory defects and restores ciliogenesis. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1233-1245. doi:10.1172/JCI60981
346. van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, et al. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest*. 2012;122(2):519-528. doi:10.1172/JCI59526
347. Rodriguez-Paris J, Schrijver I. The digenic hypothesis unraveled: the GJB6 del(GJB6-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;389(2):354-359. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.152
348. Schäffer AA. Digenic inheritance in medical genetics. *J Med Genet*. 2013;50(10):641-652. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101713
349. Isom LL. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci*. 2002;7:12-23. doi:10.2741/isom
350. Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*. 2001;30(2):515-524. doi:10.1016/s0896-6273(01)00297-5

351. Kordasiewicz HB, Thompson RM, Clark HB, Gomez CM. C-termini of P/Q-type Ca²⁺ channel α 1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Hum Mol Genet.* 2006;15(10):1587-1599. doi:10.1093/hmg/ddl080
352. Pocai A, Lam TKT, Gutierrez-Juarez R, et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature.* 2005;434(7036):1026-1031. doi:10.1038/nature03439
353. Belkaid A, Copland IB, Massillon D, Annabi B. Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin. *FEBS Lett.* 2006;580(15):3746-3752. doi:10.1016/j.febslet.2006.05.071
354. Byrne MM, Sturis J, Clément K, et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest.* 1994;93(3):1120-1130. doi:10.1172/JCI117064
355. Galcheva S, Demirbilek H, Al-Khawaga S, Hussain K. The Genetic and Molecular Mechanisms of Congenital Hyperinsulinism. *Front Endocrinol.* 2019;10. doi:10.3389/fendo.2019.00111
356. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nature Reviews Genetics.* 2013;14(5):307-320. doi:10.1038/nrg3424
357. Gajecka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics.* 2016;291(2):513-530. doi:10.1007/s00438-015-1130-7
358. D’Gama AM, Walsh CA. Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease. *Nature Neuroscience.* 2018;21(11):1504-1514. doi:10.1038/s41593-018-0257-3
359. Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, et al. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am J Hum Genet.* 2015;97(1):67-74. doi:10.1016/j.ajhg.2015.05.008
360. Bae T, Tomasini L, Mariani J, et al. Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis. *Science.* 2018;359(6375):550-555. doi:10.1126/science.aan8690

361. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science*. 2013;341(6141):1237758. doi:10.1126/science.1237758
362. Fernández-Marmiesse A, Kusumoto H, Rekarte S, et al. A novel missense mutation in GRIN2A causes a non-epileptic neurodevelopmental disorder. *Mov Disord*. 2018;33(6):992-999. doi:10.1002/mds.27315
363. Depienne C, Trouillard O, Gourfinkel-An I, et al. Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *J Med Genet*. 2010;47(6):404-410. doi:10.1136/jmg.2009.074328
364. Stosser MB, Lindy AS, Butler E, et al. High frequency of mosaic pathogenic variants in genes causing epilepsy-related neurodevelopmental disorders. *Genet Med*. 2018;20(4):403-410. doi:10.1038/gim.2017.114
365. Ewans LJ, Field M, Zhu Y, et al. Gonadal mosaicism of a novel IQSEC2 variant causing female limited intellectual disability and epilepsy. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(6):763-767. doi:10.1038/ejhg.2017.29
366. Myers CT, Hollingsworth G, Muir AM, et al. Parental Mosaicism in “De Novo” Epileptic Encephalopathies. *New England Journal of Medicine*. Published online April 25, 2018. doi:10.1056/NEJMc1714579
367. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15(9):733-747. doi:10.1038/gim.2013.92
368. Barbosa-Gouveia S, González-Vioque E, Borges F, et al. Identification and Characterization of New Variants in FOXRED1 Gene Expands the Clinical Spectrum Associated with Mitochondrial Complex I Deficiency. *J Clin Med*. 2019;8(8). doi:10.3390/jcm8081262
369. Steenweg ME, Ghezzi D, Haack T, et al. Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate “LTBL” caused

- by EARS2 mutations. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1387-1394. doi:10.1093/brain/aws070
370. Rodenburg RJT. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(2):283-292. doi:10.1007/s10545-010-9081-y
371. Morava E, Sengers R, Ter Laak H, et al. Congenital hypertrophic cardiomyopathy, cataract, mitochondrial myopathy and defective oxidative phosphorylation in two siblings with Sengers-like syndrome. *Eur J Pediatr*. 2004;163(8):467-471. doi:10.1007/s00431-004-1465-2
372. Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, et al. Targeted Next Generation Sequencing in Patients with Inborn Errors of Metabolism. *PLoS One*. 2016;11(5). doi:10.1371/journal.pone.0156359
373. McCormick EM, Zolkipli-Cunningham Z, Falk MJ. Mitochondrial Disease Genetics Update Recent insights into the Molecular Diagnosis and Expanding Phenotype of Primary Mitochondrial Disease. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(6):714-724. doi:10.1097/MOP.0000000000000686
374. Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*. 2020;56. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102784
375. Dimmock DP, Lawlor MW. Presentation and Diagnostic Evaluation of Mitochondrial Disease. *Pediatr Clin North Am*. 2017;64(1):161-171. doi:10.1016/j.pcl.2016.08.011
376. Ardui S, Ameer A, Vermeesch JR, Hestand MS. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(5):2159-2168. doi:10.1093/nar/gky066
377. McCarthy A. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences' single molecule real time technology. *Chem Biol*. 2010;17(7):675-676. doi:10.1016/j.chembiol.2010.07.004

378. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(5):278-289. doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002
379. Loomis EW, Eid JS, Peluso P, et al. Sequencing the unsequenceable: expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene. *Genome Res*. 2013;23(1):121-128. doi:10.1101/gr.141705.112
380. Faridani OR, Abdullayev I, Hagemann-Jensen M, Schell JP, Lanner F, Sandberg R. Single-cell sequencing of the small-RNA transcriptome. *Nature Biotechnology*. 2016;34(12):1264-1266. doi:10.1038/nbt.3701
381. Boycott KM, Rath A, Chong JX, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *The American Journal of Human Genetics*. 2017;100(5):695-705. doi:10.1016/j.ajhg.2017.04.003
382. Ewans LJ, Schofield D, Shrestha R, et al. Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders. *Genetics in Medicine*. 2018;20(12):1564-1574. doi:10.1038/gim.2018.39
383. Frésard L, Smail C, Ferraro NM, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. *Nature Medicine*. 2019;25(6):911-919. doi:10.1038/s41591-019-0457-8
384. Barbosa M, Joshi RS, Garg P, et al. Identification of rare de novo epigenetic variations in congenital disorders. *Nature Communications*. 2018;9(1):2064. doi:10.1038/s41467-018-04540-x
385. Suter CM, Martin DIK. Inherited epimutation or a haplotypic basis for the propensity to silence? *Nature Genetics*. 2007;39(5):573-573. doi:10.1038/ng0507-573a
386. Cropley JE, Martin DIK, Suter CM. Germline epimutation in humans. *Pharmacogenomics*. 2008;9(12):1861-1868. doi:10.2217/14622416.9.12.1861
387. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing.

- Science Translational Medicine.* 2017;9(386).
doi:10.1126/scitranslmed.aal5209
388. Berberich AJ, Ho R, Hegele RA. Whole genome sequencing in the clinic: empowerment or too much information? *CMAJ.* 2018;190(5):E124-E125. doi:10.1503/cmaj.180076
389. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):253-268. doi:10.1038/nrg.2017.116
390. Whitcomb DC, Shelton CA, Brand RE. Genetics and Genetic Testing in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1252-1264.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.057
391. Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, et al. Exome sequence analysis suggests genetic burden contributes to phenotypic variability and complex neuropathy. *Cell Rep.* 2015;12(7):1169-1183. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.023
392. Bis-Brewer DM, Züchner S. Perspectives on the Genomics of HSP Beyond Mendelian Inheritance. *Front Neurol.* 2018;9. doi:10.3389/fneur.2018.00958
393. Nam SH, Kanwal S, Nam DE, et al. Association of miR-149 polymorphism with onset age and severity in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(6):502-507. doi:10.1016/j.nmd.2018.04.002
394. Giannopoulou E, Katsila T, Mitropoulou C, Tsermpini E-E, Patrinos GP. Integrating Next-Generation Sequencing in the Clinical Pharmacogenomics Workflow. *Front Pharmacol.* 2019;10. doi:10.3389/fphar.2019.00384
395. Neville KA, Becker ML, Goldman JL, Kearns GL. Developmental pharmacogenomics. *Pediatric Anesthesia.* 2011;21(3):255-265. doi:10.1111/j.1460-9592.2011.03533.x
396. Russo R, Capasso M, Paolucci P, Iolascon A, TEDDY European Network of Excellence. Pediatric pharmacogenetic and pharmacogenomic studies: the current state and future perspectives.

- Eur J Clin Pharmacol.* 2011;67 Suppl 1:17-27. doi:10.1007/s00228-010-0931-1
397. Haga SB. Pharmacogenomic Testing In Pediatrics: Navigating The Ethical, Social, And Legal Challenges. *Pharmgenomics Pers Med.* 2019;12:273-285. doi:10.2147/PGPM.S179172
398. Ji Y, Si Y, McMillin GA, Lyon E. Clinical pharmacogenomics testing in the era of next generation sequencing: challenges and opportunities for precision medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(5):411-421. doi:10.1080/14737159.2018.1461561
399. Ormondroyd E, Mackley MP, Blair E, et al. Insights from early experience of a Rare Disease Genomic Medicine Multidisciplinary Team: a qualitative study. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(6):680-686. doi:10.1038/ejhg.2017.37
400. Liu H-Y, Zhou L, Zheng M-Y, et al. Diagnostic and clinical utility of whole genome sequencing in a cohort of undiagnosed Chinese families with rare diseases. *Scientific Reports.* 2019;9(1):19365. doi:10.1038/s41598-019-55832-1
401. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *npj Genomic Medicine.* 2018;3(1):1-10. doi:10.1038/s41525-018-0053-8
402. Petrikin JE, Willig LK, Smith LD, Kingsmore SF. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin Perinatol.* 2015;39(8):623-631. doi:10.1053/j.semperi.2015.09.009
403. Francescatto L, Katsanis N. Newborn screening and the era of medical genomics. *Semin Perinatol.* 2015;39(8):617-622. doi:10.1053/j.semperi.2015.09.010
404. French CE, Delon I, Dolling H, et al. Whole genome sequencing reveals that genetic conditions are frequent in intensively ill children. *Intensive Care Med.* 2019;45(5):627-636. doi:10.1007/s00134-019-05552-x

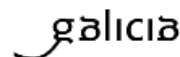
9. ANEXO



9.36. Ditame del Comité de Ética



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; cetic@sergas.es



DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 19/04/2016 o estudo:

Título: Creación de una herramienta (NeuroMeGen) para el diagnóstico de enfermedades neurometabólicas congénitas e implementación en el SNS

Promotor: INSCIII

Tipo de estudo: Outros

Código de Rexistro: 2015/410

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así como os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así como os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
C.H. Universitario de Santiago	María Luz Couce Pico

En Santiago de Compostela, a 19 de abril de 2016

O secretario



Juan M. Vázquez Lago

9.37. Isodisomía Maternal – Paciente 146

9.37.1. Primers diseñados para PCR alelo-específica

Aproximadamente de 1200pb, Tm:62°-mastermix

Primers diseñados:

- mutado (Con delección)

TTN-203R: TTGTGCC[]AGAAAACACTGGT;

- salvaje (Sin delección)

TTN-203R: TGCCAGAAAAGAAAACACTGG

9.37.2. SNPs informativos para confirmación de la isodisomia maternal en cromosoma 2, en el paciente 146

rs2276625	rs16866380	rs2366751	rs2042996	rs2562839	rs3219169
rs1863059	rs3829749	rs3829746	rs1560221	rs12693164	rs2276615
rs76414720	rs3813250	rs3731746	rs2163009	rs2562838	rs3219153
rs6720741	rs3731752	rs3731744	rs1001238	rs2562836	rs1131296
rs61748157	rs2278196	rs3813243	rs72646807	rs13390491	rs2270669
rs72481904	rs72648270	rs2288571	rs12994774	rs2627043	rs6728818
rs13013209	rs3731750	rs2303838	rs35112591	rs62178978	
rs2562830	rs12693166	rs2742327	rs17076	rs12993099	
rs16866378	rs9808377	rs4894029	rs2042995	rs16866465	
rs746578	rs13388274	rs35830636	rs3790993	rs4433949	

9.38. TABLAS DE LOS RESULTADOS GENÉTICOS DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO POSITIVO Y NO CONCLUYENTE

9.38.1. ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO

Panel Hipoglucemia e Hiper glucemia - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
4	TRANS	SLC22A5	AR	HT C	MISS	c.34G>A	LP	VUS	rs139203363	0.000711	0.9987	4,99
4	TRANS	SLC22A5	AR	HT C	MISS	c.1463G>A	LP	P	rs28383481	0.00325	0.9993	5,77
66	MAT	PHKA2	XLR	HE	SPL	c.1245+1G>T	P	-	-	-	0.9957	5,28
277	TRANS	AGL	AR	HO	FS	c.100delC	LP	-	-	-	-	4,97
645	ND	PHKA2	XLR	HE	FS	c.3547_3548insGG TGCCATGGACACC CTGGAGA	LP	-	-	-	-	3,60
697	TRANS	GALT	AR	HO	MISS	c.443G>A	LP	P/LP	rs111033694	0.000024	0.9988	5,30
763	ND	PHKA2	XLR	HE	MISS	c.3614C>T	LP	P	rs137852288	-	0.9986	5,88
764	ND	PHKA2	XLR	HE	MISS	c.2746C>T	LP	P	-	-	0.9991	4,38
1210	TRANS	ALDOB	AR	HO	MISS	c.448G>C	LP	P	rs1800546	-	0.9978	6,17

Panel Hipoglicemia e Hiperglicemia - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
251	ND	CEL	AD	HT	MISS	c.1810G>C	VUS	-	-	-	0.8027	-1,89
251	ND	CEL	AD	HT	MISS	c.1975G>C	VUS	-	-	-	0.8186	1,19
468	ND	ABCC8	AD, AR	HT	CNV _DEL	g.(?_17464699)_ 7464884_?)del	-	-	-	-	-	-
468	ND	ABCC8	AD, AR	HT	CNV _DEL	g.(?_17464241)_ 7464454_?)del	-	-	-	-	-	-
586	MAT	GLUD1	AD	HT	MISS	c.272C>T	VUS	-	-	-	0.9753	3,09
663	MAT	PHKA2	XLR	HT	MISS	c.2870A>G	VUS	-	rs755911581	0.000076	0.9982	4,88
734	ND	ETFDH	AR	HT	NON	c.1274C>G	P	-	-	-	0.9959	5,42
758	ND	CPS1	AR	HT	MISS	c.1201G>C	P	VUS	rs760895692	0.00002	0.9982	5,88
758	ND	CPS1	AR	HT	MISS	c.2810T>A	VUS	VUS	rs760714614	0.00002	0.9902	5,47
1138	PAT	PDX1	AD, AR	HT	MISS	c.779G>A	VUS	-	rs116405576 3	-	0.9967	3,28
1167	ND	ABCC8	AD, AR	HT	MISS	c.3004G>A	VUS	-	rs144329652	0.000028	0.8568	4,30
1167	ND	SLC37A4	AR	HT	MISS	c.1225A>G	VUS	-	rs782480303	0.000080	0.9466	5,27
1167	ND	SLC37A4	AR	HT	MISS	c.1022C>T	VUS	-	rs191545031	0.00288	0.5537	5,03
1196	ND	PHKA2	XLD	HT	MISS	c.2911C>T	VUS	-	rs768601102	-	0.9987	6,06

Panel Defectos del Metabolismo Intermediario - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
22	PAT	AMT	AR	HT C	MISS	c.2T>C	P	-	rs1266259634	0.000004	0.9627	4,87
22	MAT Y HNO	AMT	AR	HT C	SPL	c.878-1G>A	P	P	rs181134220	0.000017	0.9936	4,77
59	TRANS	GLDC	AR	HO	MISS	c.2714T>G	LP	-	rs188269735	0.000048	0.9966	5,33
68	ND	MOCS2	AR	HO	MISS	c.244A>T	LP	-	rs776441627	0.000024	0.9711	5,88
254	TRANS	TCN2	AR	HO	CNV-DEL	g.(?_31018929)_(31019095_?)del	-	-	-	-	-	-
633	TRANS	PAH	AR	HT	MISS	c.842C>T	LP	LP	rs5030851	0.000103	0.9988	5,73
633	TRANS	PAH	AR	HT	MISS	c.490A>G	LP	LP	rs199475647	0.000016	0.9973	6,08
634	PAT	PAH	AR	HT C	MISS	c.782G>A	LP	LP	rs5030849	0.000223	0.9996	5,72
634	MAT	PAH	AR	HT C	MISS	c.136G>A	P	P	rs74603784	0.000077	0.9989	5,46
657	TRANS	MCCC2	AR	HT C	MISS	c.1015G>A	LP	LP	rs150591260	0.000784	0.9986	5,65
657	TRANS	MCCC2	AR	HT C	MISS	c.1423G>A	p	P/LP	rs148773718	0.000096	0.9994	5,83
662	MAT	HPRT1	XLR	HE	MISS	c.424A>G	LP	-	-	-	0.9978	5,56
692	TRANS Y HNO	ETFDH	AR	HO	MISS	c.1601C>T	LP	P	rs200920510	-	0.9989	5,60
711	PAT	MOCOS	AR	HT C	FS	c.2356del	LP	-	-	-	-	1,93
711	MAT	MOCOS	AR	HT C	MISS	c.512C>T	VUS	-	rs150556770	0.00114	0.9253	5,32
760	TRANS	PAH	AR	HT C	MISS	c.782G>A	LP	P	rs5030849	0.000223	0.9996	5,72

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

760	TRANS	PAH	AR	HT C	SPL	c.1066-11G>A	LP	P	rs5030855	0.000247	0.3767	3,73
852	TRANS	PAH	AR	HT C	MISS	c.1162G>A	LP	P	rs62516101	0.000084	0.9989	5,34
852	TRANS	PAH	AR	HT C	MISS	c.728G>A	LP	P	rs62508588	0.000076	0.9996	5,92
1083	PAT	PAH	AR	HT C	MISS	c.1169A>G	LP	P	rs5030856	0.00099	0.9984	5,34
1083	MAT	PAH	AR	HT C	DEL	c.116_118deITCT	LP	P	rs199475565/rs1168239323	0.000016	-	5,46
1096	TRANS	PAH	AR	HT C	MISS	c.261C>A	P	P/LP	rs62516151	0.000076	0.9735	1,30
1096	TRANS	PAH	AR	HT C	SPL	c.1315+1G>A	P	P	rs5030861	0.000398	0.9953	5,33

Panel Defectos del Metabolismo Intermediario - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
96	ND	IDH2	AD	HT	MISS	c.419G>A	VUS	P	rs121913502	0.000032	0.9991	4,75
286	ND	UMPS	AR	HT	NON	c.1213C>T	P	-	rs199644027	0.000004	0.9975	4,75
920	MAT	PRODH	AR	HT	MISS	c.1397C>T	VUS	P/LP/B	rs2870984	0.00463	0.9989	3,10

Panel Enfermedades Mitocondriales - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
12	PAT	<i>GFM1</i>	AR	HT C	MISS	c.2011C>T	LP	P/LP	rs201408725	0.000064	0.9992	5,8
12	MAT	<i>GFM1</i>	AR	HT C	FS	c.1401delA	P	-	rs779877297	0.000016	-	6,17
43	PAT Y HNO	<i>FOXRED1</i>	AR	HT C	MISS	c.920G>A	LP	LP	rs145888229	0.000174	0.9958	5,63
43	MAT Y HNO	<i>FOXRED1</i>	AR	HT C	SPL	c.733+1G>A	P	-	rs754952690	0.00004	0.9926	3,83
65	TRANS	<i>TSM</i>	AR	HO	MISS	c.719G>C	LP	-	rs750799705	0.000004	0.8667	5,10
142	DN	<i>DNM1L</i>	AD, AR	HT	MISS	c.1337G>T	LP	LP	rs879253874	-	0.9917	5,14
163	TRANS	<i>AGK</i>	AR	HO	SPL	c.518+1G>A	P	-	-	-	0.9955	5,20
163	PAT	<i>EARS2</i>	AR	HT C	MISS	c.1045G>A	VUS	VUS	rs187662524	0.00138	0.9974	3,54
163	MAT	<i>EARS2</i>	AR	HT C	MISS	c.494A>G	LP	-	rs376918203	0.000017	0.9984	4,45
172	PAT	<i>EARS2</i>	AR	HT C	MISS	c.319C>T	VUS	-	rs135568545 3	0.000009	0.9986	3,59
172	MAT	<i>EARS2</i>	AR	HT C	MISS	c.322C>T	LP	VUS/P/LP	rs376103091	0.000151	0.9991	4,69
179	DN	<i>OPA1</i>	AD	HT	MISS	c.1710T>G	P	-	-	-	0.9986	3,29
192	DN	<i>PDHA1</i>	XLR	HE	MISS	c.787C>G	LP	P	rs137853259	-	0.9983	4,77
205	PAT Y HNO	<i>FBXL4</i>	AR	HT C	SPL	c.858+5G>C	LP	LP	rs125776568 2	-	0.9748	4,91
205	MAT Y HNO	<i>FBXL4</i>	AR	HT C	MISS	c.1510T>C	LP	-	-	-	0.9977	5,82
215	PAT Y HNA	<i>FARS2</i>	AR	HT C	MISS	c.1256G>A	LP	LP	rs202183509	0.00002	0.9995	5,81

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

215	MAT	FARS2	AR	HT C	CNV _DEL	g.(?_5404749)_(54 04959_?)del	-	-	-	-	-	-
235	TRANS	ACAD9	AR	HT C	FS	c.358delT	P	LP	rs863224844 /rs13679811 02	0.000101	-	3,46
235	TRANS	ACAD9	AR	HT C	SPL	c.809-2A>G	P	-	-	-	0.9954	5,27
250	PAT	MTO1	AR	HT C	MISS	c.170G>T	LP	-	-	-	0.9981	5,76
250	MAT	MTO1	AR	HT C	MISS	c.1450C>T	LP	VUS/P	rs748152539	0.00002	0.9989	2,07
252	MAT	GFM1	AR	HT C	MISS	c.640A>T	LP	-	rs376046377	-	0.9809	-3,77
252	PAT	GFM1	AR	HT C	MISS	c.1199G>C	LP	-	rs139692119	0.00008	0.9973	4,01
292	TRANS	COX15	AR	HO	MISS	c.649C>T	LP	P	rs28939711	0.000032	0.9991	4,61
362	PAT	EARS2	AR	HT C	MISS	c.670G>A	LB	B	rs141129877	0.000869	0.9986	5,56
362	MAT	EARS2	AR	HT C	NON	c.376C>T	P	-	-	-	0.9961	4,69
389	PAT Y HNO	ACAD9	AR	HT C	MISS	c.737T>C	LP	-	-	-	0.9985	4,31
389	MAT Y HNO	ACAD9	AR	HT C	MISS	c.860G>A	LP	-	rs762883679	0.000016	0.9936	4,89
403	TRANS	C12orf65	AR	HO	FS	c.207_220del	LP	-	rs138051395 0	-	-	-6,62
825	TRANS	PET100	AR	HO	MISS	c.1A>G	LP	-	rs977392512	0.000007	0.9866	5,09
889	MAT	EARS2	AR	HT C	MISS	c.184A>T	VUS	-	rs119654172 9	-	0.9642	2,05
889	PAT	EARS2	AR	HT C	MISS	c.920T>C	LP	-	rs770916034	0.000013	0.9973	5,46
919	PAT Y TIO	COQ4	AR	HT C	MISS	c.202G>C	LP	LP/VUS	rs758522459	0.000043	0.9952	5,49
919	MAT Y HNO	COQ4	AR	HT C	MISS	c.718C>T	LP	P/LP	rs143441644	0.000198	0.9994	5,52

1060 | TRANS SUCLA2 AR HO MISS c.850C>T LP P rs121908538 0.000032 0.9991 5,67

Panel Enfermedades Mitocondriales - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
11	PAT	UPB1	AR	HT	NON	c.422C>G	P	-	-	-	0.9962	5.72
11	PAT	UPB1	AR	HT	SYN	c.423A>T	VUS	-	-	-	0.7957	5.72
88	PAT	BCS1L	AR	HT	NON	c.166C>T	P	P/LP	rs121908576	0.000167	0.9961	2,23
129	MAT	ADCK4	AR	HT	MISS	c.103G>A	VUS	-	-	-	0.8354	1,16
130	DN	ADCK4	AR	HT	MISS	c.418G>A	LP	-	rs1350822919	0.000004	0.9993	4,72
242	ND	DNM1L	AD, AR	HT	MISS	c.1921G>A	VUS	VUS	rs863223952	-	0.9988	5,52
372	MAT	NDUFAF2	AR	HT	FS	c.490delG	VUS	VUS	rs1064793214	0.000347	-	5,64
536	ND	SLC6A8	XLR	HE	MISS	c.928G>A	VUS	-	-	-	0.9989	5,07
544	MAT	PNPT1	AR	HT	MISS	c.493C>T	VUS	LP	rs151166046	0.000155	0.999	5,24
566	MAT	NDUFB11	XL	HT	MISS	c.152C>A	VUS	LB	rs150506634	0.000433	0.9775	4,10
592	MAT	POLG2	AD	HT	MISS	c.799G>A	VUS	-	-	-	0.9992	5,43
599	ND	PNPT1	AR	HT	SPL	c.1177-2A>C	P	-	-	-	0.9952	5,51
599	ND	PNPT1	AR	HT	MISS	c.1519G>T	VUS	VUS	rs143712760	0.000207	0.9969	5,52
661	MAT	LETM1	AD	HT	MISS	c.709C>T	VUS	-	-	-	0.9991	4,14

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

787	PAT	RRM2B	AD	HT	MISS	c.139A>G	VUS	-	rs129623726 1	0.000004	0.999	5,61
847	TRANS	POLRMT	-	HO	MISS	c.3596T>C	VUS	-	rs151287767	0.00616	0.3191	-5,27
903	PAT	FLAD1	AR	HT	MISS	c.1033C>T	VUS	-	rs61740252	-	0.9965	5,51
903	PAT	FLAD1	AR	HT	MISS	c.1589G>A	VUS	-	rs146007674	0.000167	0.9994	4,64
943	ND	DARS2	AR	HT	SPL	c.396+2T>G	P	P	rs759123043	0.000028	0.992	6,07
1095	ND	SPG7	AD, AR	HT	MISS	c.1529C>T	VUS	P/LP	rs61755320	0.00292	0.9992	5,42

Panel Defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
14	MAT Y HNA	TREX1	AR	HT C	MISS	c.218C>T	LP	VUS/P	rs755919767	0.000024	0.9986	4,99
14	PAT Y HNA	TREX1	AR	HT C	MISS	c.404A>C	LP	-	-	-	0.9898	4,99
56	MAT	TPP1	AR	HT C	NON	c.622C>T	P	P	rs119455955	0.000223	0.9966	4,10
56	PAT	TPP1	AR	HT C	SPL	c.887-10T>C	VUS	VUS/P	rs755445790	0.00147	0.479	1,33
60	PAT	HEXA	AR	HT C	MISS	c.533G>A	LP	P	rs28941770	0.000048	0.9994	5,44
60	MAT	HEXA	AR	HT C	MISS	c.380T>G	LP	P	rs121907975	-	0.9975	5,30
98	MAT Y HNO	POLR3B	AR	HT C	MISS	c.1244T>C	LP	P	rs199504211	0.000554	0.9932	5,75
98	PAT Y HNO	POLR3B	AR	HT C	MISS	c.2740G>A	LP	-	rs138133989 1	-	0.9993	5,54
114	TRANS	PPT1	AR	HO	MISS	c.541G>T	P	LP	rs148412181	0.000012	0.9923	4,85

ANEXOS

116	TRANS	GNPTAB	AR	HO	MISS	c.1325G>A	LP	P	rs281864975	-	0.9981	5,71
117	MAT	HSD17B4	AR	HT C	MISS	c.1273T>C	LP	-	-	-	0.9771	1,42
117	PAT	HSD17B4	AR	HT C	MISS	c.1528G>A	LP	LP	rs191468413	0.000016	0.9988	5,61
137	MAT	SLC17A5	AR	HT C	NON	c.918T>G	P	P	rs201284672	0.000084	0.997	2,28
137	PAT	SLC17A5	AR	HT C	MISS	c.1239C>G	LP	-	-	-	0.9985	5,40
221	TRANS	PLA2G6	AR	HO	FS	c.1460_1462del	LP	-	-	-	-	5,61
228	PAT	NAGLU	AR	HT C	SPL	c.531+5G>A	VUS	-	-	-	0.9584	3,33
228	MAT	NAGLU	AR	HT C	NON FS	c.1045_1047del	LP	-	-	-	-	4,70
231	TRANS	POLR3A	AR	HT C	FS	c.2376_2377delAT	LP	-	-	-	-	6,03
231	TRANS	POLR3A	AR	HT C	MISS	c.2081G>A	LP	-	rs376405070	0.000016	0.9992	4,89
234	TRANS	GBA	AR	HT C	MISS	c.1226A>G	LP	P	rs76763715	0.00231	0.9971	3,53
234	TRANS	GBA	AR	HT C	MISS	c.930T>A	VUS	-	-	-	0.9799	-0,21
368	TRANS	PEX12	AR	HO	FS	c.888_889del	LP	P	rs398123301	0.000127	-	4,92
483	TRANS	CLN6	AR	HO	FS	c.829_836delinsCC T	LP	-	-	-	-	3,19
513	TRANS	CTSA	AR	HO	MISS	c.1252G>T	LP	-	-	-	0.9953	5,56
667	MAT	SGSH	AR	HT C	SPL	c.355+1G>A	P	-	-	-	0.9938	3,65
667	PAT	SGSH	AR	HT C	FS	c.1080delC	P	P	rs770947426	0.000072	-	4,45
670	DN	GNE	AD, AR	HT	MISS	c.797G>A	LP	P	rs121908622	-	0.9996	4,86
715	MAT	SGSH	AR	HT C	MISS	c.1127T>C	LP	-	rs775729169	0.000004	0.9757	4,45
715	PAT	SGSH	AR	HT C	MISS	c.197C>G	LP	-	rs104894637	0.000093	0.9919	3,89

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

746	MAT	SLC16A2	XLR	HE	FS	c.46delC	LP	-	-	-	-	3,13
848	PAT	GBA	AR	HT C	MISS	c.1193G>A	LP	-	rs74979486	-	0.9995	3,67
848	MAT	GBA	AR	HT C	MISS	c.155C>T	LP	-	rs127572418 8	0.000004	0.9939	1,52
922	MAT	NAGLU	AR	HT C	MISS	c.1562C>T	LP	CONFLIC T	rs104894595	0.000020	0.9991	4,69
922	PAT	NAGLU	AR	HT C	MISS	c.1693C>T	LP	P	rs104894597	0.000032	0.9992	3,65
1165	TRANS	GAA	AR	HT	NON	c.343C>T	P	LP	rs786204614	-	0.9961	1,46
1165	TRANS	GAA	AR	HT	SPL	c.-32-13T>G	LP	P	rs386834236	0.00344	0.6248	-1,68

Panel Defectos en el Metabolismo de Moléculas Complejas y Leucodistrofias - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Proteína	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
31	MAT	PPT1	AR	HT	MISS	c.2T>C	P	P/LP	rs796052927	-	0.9541	4.44
34	ND	CLN6	AR	HT	MISS	c.314C>T	VUS	-	rs769747737	0.000004	0.9987	51,39
851	ND	RNASEH2B	AR	HT	MISS	c.655T>C	VUS	P/LP	rs75184679	0.0014	0.9967	5,78

9.38.2. ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

Panel de Epilepsia - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alé o	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
9	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.319C>T	LP	P	rs864321712	-	0.9986	3,89
26	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.1657C>T	LP	P	rs759584387	0.000004	0.9992	4,99
47	DN	CDKL5	XL	HT	MISS	c.176G>C	LP	LP	-	-	0.998	5,69
52	DN	SCN1A	AD	HT	MISS	c.4352C>T	LP	LP	rs121917945	-	0.9987	5,29
71	DN	SCN1A	-	HT	CNV_ DUP	g.(?_166847704)_(166930181_?)dup	-	-	-	-	-	-
71	DN	SCN2A	-	HT	CNV_ DUP	g.(?_166152283)_(166246384_?)dup	-	-	-	-	-	-
71	DN	SCN9A	-	HT	CNV_ DUP	g.(?_167055131)_(167168316_?)dup	-	-	-	-	-	-
90	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.821C>T	LP	P	rs727503974	-	0.9991	4,01
91	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.388G>A	LP	P	rs864321710	-	0.9991	3,61
131	DN	CDKL5	XL	HT	MISS	c.455G>A	LP	LP	-	-	0.9974	6,07
155	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.917C>T	LP	P/LP	rs864321707	-	0.9989	4,01
156	DN	CDKL5	XL	HT	FS	c.2635_2636del	P	P/LP	-	-	-	1,48
158	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.850T>G	P	LP	rs864321706	-	0.9925	4,01
186	DN	ARHGEF9	XLR	HT	MISS	c.541G>C	LP	LP	-	-	0.9994	5,65
202	DN	CDKL5	XL	HT	FS	c.163_166del	P	LP	-	-	-	4,59

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

218	DN	<i>GRIN2A</i>	AD	HT	MISS	c.2069C>T	LP	CONFLICT	rs1445802934	0.000004	0.9992	5,65
310	DN	<i>HNRNPU</i>	AD	HT	FS	c.401_402delAC	P	LP	-	-	-	4,34
385	DN	<i>MECP2</i>	XLD , XLR	HE	NON	c.1350C>G	P	LP	-	-	0.9956	5,67
406	DN	<i>SCN1A</i>	AD	HT	NON	c.2728C>T	P	LP	-	-	0.9985	5,08
420	DN	<i>FOGX1</i>	AD	HT	NON	c.764G>A	P	LP	-	-	0.9964	4,05
421	TRANS	<i>TBC1D24</i>	AR	HO	MISS	c.724C>T	LP	P/LP	rs398122965	0.000012	0.9992	4,20
427	DN	<i>FOGX1</i>	AD	HT	NON	c.256C>T	P	LP	rs398124202	-	0.9969	2,03
472	DN	<i>CDKL5</i>	XL	HE	NON	c.2413C>T	P	LP	rs267608659	-	0.998	6,03
473	DN	<i>CDKL5</i>	XL	HT	MISS	c.616G>T	LP	LP	-	-	0.9958	6,10
475	DN	<i>KCNQ2</i>	AD	HT	MISS	c.778C>T	LP	LP	-	-	0.9927	3,38
481	DN	<i>DNM1</i>	AD	HT	MISS	c.442C>A	LP	LP	-	-	0.9961	5,42
501	MAT	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	p.Leu929Phe	LP	-	-	-	0.9989	5,18
501	TRANS	<i>SLC12A5</i>	AR	HO	MISS	c.3274G>A	LP	LP	-	-	0.9988	3,47
545	DN	<i>ARX</i>	XLD , XLR	HT	MISS	c.1039T>G	LP	LP	-	-	0.9719	3,87
548	MAT, HNO Y TIO	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	c.4973C>T	LP	LP/VUS	rs121917922	-	0.9991	5,27
561	TRANS	<i>RFT1</i>	AR	HO	MISS	c.47C>G	LP	VUS	rs148716754	0.000549	0.9919	6,03
572	ND	<i>MECP2</i>	XLR	HE	MISS	c.917G>A	LP	P	rs61751443	-	0.9993	5,06
597	DN	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	c.4997C>T	LP	LP	rs794726760	-	0.9986	5,27

ANEXOS

598	DN	<i>STXBP1</i>	AD	HT	MISS	c.416C>T	LP	P/LP	rs796053353	-	0.9989	5,71
651	DN	<i>SCN1A</i>	AD	HT	NON	c.664C>T	P	P	rs121918624	-	0.9974	5,77
658	DN	<i>HCN1</i>	AD	HT	MISS	c.1172G>A	LP	LP	rs105751954 7	-	0.9986	5,42
660	DN	<i>SCN8A</i>	AD	HT	MISS	c.2620G>A	LP	LP	-	-	0.9991	4,45
685	DN	<i>RHOBTB2</i>	AD	HT	MISS	c.1531C>T	LP	LP	-	-	0.9992	5,08
716	DN	<i>SCN1A</i>	AD	HT	FS	c.2020_2023del	P	LP	-	-	-	4,90
759	DN	<i>SCN2A</i>	AD	HT	MISS	c.2995G>A	LP	P/LP	rs796053126	-	0.9994	5,69
829	MAT, HNO, TIO	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	c.5456C>A	LP	-	-	-	0.9933	5,79
832	DN	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	c.338C>G	LP	LP	-	-	0.9981	4,57
860	DN	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	c.493T>C	LP	LP	-	-	0.9984	5,24
868	DN	<i>KCNA2</i>	AD	HT	MISS	c.959C>T	LP	LP	-	-	0.9987	5,87
872	DN	<i>FOXC1</i>	AD	HT	MISS	c.565C>T	LP	-	-	-	0.9985	3,09
901	MAT, HNO, ABUELA, TIO	<i>CLCN4</i>	XLD , XLR	HE	MISS	c.1576G>A	LP	LP	-	-	0.9984	5,69
918	MAT	<i>MTOR</i>	AD	HT	MISS	c.7249G>A	LP	-	rs139064506 5	0.000008	0.9987	5,89
954	MAT	<i>PROSC</i>	AR	HT	MISS	c.157A>G	VUS	-	rs79148472	0.0044	0.9829	3,19
954	PAT	<i>PROSC</i>	AR	HT	MISS	c.445G>A	LP	-	rs150307985	0.000056	0.9987	4,94
968	MAT	<i>SCN1A</i>	AD	HT	MISS	p.Leu929Phe	LP	-	-	-	0.9989	5,18
968	PAT	<i>CACNA1A</i>	AD	HT	MISS	p.Arg1060His	VUS	-	-	-	0.9326	0,29
968	MAT	<i>SLC12A5</i>	AR	HO	MISS	c.3274G>A	LP	LP	-	-	0.9988	3,47

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

1058	DN	IL1RAPL1	XLR	HE	CNV_DEL	g.(?_28807412)_(29938236_?)del	-	-	-	-	-	-
1112	PAT	SCN1A	AD	HT	MISS	c.5009T>C	LP	-	-	-	0.9971	5,27
1177	ND	CLCN4	XL	HE	MISS	c.1597G>A	LP	-	-	-	0.9991	5,25
1197	DN	DHDDS	AD, AR	HT	MISS	c.110G>A	VUS	P/VUS	-	-	0.9996	5,72
1198	DN	SCN1A	AD	HT	MISS	c.4658T>C	LP	-	-	-	0.9992	5,90
1208	DN	GNAO1	AD	HT	MISS	c.607G>A	VUS	P	rs587777057	-	0.9992	5,28

Panel de Epilepsia - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
29	MAT	JRK	-	HT	MISS	c.1228C>G	VUS	-	-	-	0.6014	3,67
30	ND	PNKP	AR	HT	MISS	c.53A>T	VUS	VUS	rs200611702	0.000641	0.9679	3,97
33	MAT Y HNOS	SCN9A	AD	HT	MISS	c.469T>C	VUS	-	rs1319079239	0.000004	0.9922	5,43
37	ND	PRRT2	AD	HT	CNV_DEL	c.3924A>T	-	-	-	-	-	-
84	ND	KCNQ3	AD	HT	MISS	c.1421G>T	LP	LP	-	-	0.9989	5,51
93	PAT	SCN9A	AD	HT	MISS	c.2526G>C	VUS	-	rs1008544873	-	0.9984	5,85
102	ND	KCNQ3	AD	HT	SPL	c.3274T>C	VUS	-	-	-	0.7476	-1,55
207	ND	PRRT2	AD	HT	FS	g.(?_6366971)_(6367083_?)del	P	P/LP	-	-	-	3,90
245	MAT	SCN1A	AD	HT	MISS	g.(?_6704579)_(6704676_?)del	VUS	LB	rs121917910	0.000607	0.9864	5,46

ANEXOS

268	PAT	KCNT1	AD	HT	MISS	g.(?_67291192)_(67291284_?)del	VUS	-	-	-	0.9979	3,54
314	ND	SCN2A	AD	HT	NON	g.(?_67243182)_(67243239_?)del	P	P/LP	rs796053138	-	0.9657	0,24
337	MAT	DEPDC5	AD	HT	MISS	c.433C>G	VUS	-	rs368375649	0.000096	0.9972	
379	ND	SCN2A	AD	HT	MISS	c.655C>G	VUS	LB/VUS	rs149987700	0.000124	0.9719	5,29
485	ND	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.13490G>A	LP	LP	-	-	0.9969	4,01
510	MAT	CACNA2D1	AD	HT	STOP LOSS	c.5551C>T	VUS	-	rs759988243	0.000008	0.846	4,96
514	ND	CACNA1H	AD	HT	MISS	c.1825G>A	VUS	-	rs370434906	0.000004	0.9984	1,98
519	PAT	RBFOX1	AD	HT	CNV_ DEL	c.376T>A	-	-	-	-	-	-
519	PAT	RBFOX1	AD	HT	CNV_ DEL	c.1588G>A	-	-	-	-	-	-
530	MAT Y ABUELA	GPHN	AR	HT	CNV_ DEL	c.157C>T	-	-	-	-	-	-
530	MAT Y ABUELA	GPHN	AR	HT	CNV_ DEL	c.1604G>A	-	-	-	-	-	-
606	ND	GNAO1	AD	HT	MISS	g.(?_67243157)_(67647704_?)del	VUS	VUS	-	-	0.9949	4,24
627	ND	SYN1	XL	HE	MISS	c.1016T>A	VUS	VUS	rs41298474	0.00124	0.9923	5,04
629	ND	PRRT2	AD	HT	FS	c.803C>T	VUS	P	-	0.00374	3,9	3,90
647	MAT	SPTAN1	AD	HT	MISS	c.824G>A	VUS	VUS	rs754419719	0.000004	0.9985	5,11
650	PAT	FOXG1	AD	HT	MISS	c.775A>G	VUS	-	-	-	0.9988	3,69
652	ND	SCN1A	AD	HT	MISS	c.837C>T	LP	LP	rs121917915	-	0.9955	5,90
676	ND	GABBR2	AD	HT	MISS	c.949G>A	VUS	-	-	-	0.9977	5,64
682	MAT	RYR3	AD	HT	MISS	c.2912_2913delins AT	VUS	-	-	-	0.9436	5,24

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

703	PAT	SCN2A	AD	HT	MISS	c.900C>A	VUS	LP	-	-	0.9988	3,68
727	MAT	CHRNA4	AD	HT	MISS	c.718G>A	VUS	VUS	rs201168195	0.000089	0.9986	4,43
738	ND	FOXG1	AD	HT	MISS	c.1228C>G	VUS	VUS	-	-	0.9855	1,65
740	MAT	SYN1	XL	HE	MISS	c.53A>T	VUS	VUS	-	-	0.9607	4,01
744	MAT NO PORTAD ORA FALTA PAT	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.469T>C	VUS	LP	rs897976020	0.000012	0.9992	5,37
754	MAT	GABRB1	AD	HT	MISS	c.3924A>T	VUS	LP	rs1135401786	-	0.999	3,29
781	ND	SCN2A	AD	HT	MISS	c.1421G>T	VUS	LP	-	-	0.9913	5,50
782	ND	SRGAP2	AD	HT	CNV_ DUP	c.2526G>C	-	-	-	-	-	-
801	MAT	SCN1A	AD	HT	MISS	c.3274T>C	VUS	VUS	rs184524479	0.000012	0.9656	4,33
810	ND	SMARCA1	XL	HE	SYN	g.(?_6366971)_(63 67083_?)del	VUS	-	-	-	0.888	4,50
819	MAT	GPHN	AR	HT	CNV_ DEL	g.(?_6704579)_(67 04676_?)del	-	-	-	-	-	-
857	ND	ARHGEF15	AD	HT	NONFS	g.(?_67291192)_(6 7291284_?)del	VUS	LP	-	-	-	-0,65
859	ND	SLC35A2	XL	HT	FS	g.(?_67243182)_(6 7243239_?)del	LP	-	-	-	-	4,27
875	PAT	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.433C>G	VUS	LP	-	-	0.9932	4,34
884	ND	ARHGEF9	XLR	HT	MISS	c.655C>G	VUS	-	-	-	0.9862	5,46
887	PAT	CHRNA4	AD	HT	MISS	c.13490G>A	VUS	-	-	-	0.9989	5,06
904	PAT	GABRG2	AD	HT	NON	c.5551C>T	P	LP	-	-	0.9977	5,56
933	ND	SYNJ1	AR	HT	MISS	c.1825G>A	VUS	VUS	rs114053718	0.000127	0.9977	5,64

ANEXOS

937	ND	SCN1A	AD	HT	MISS	c.376T>A	LP	P	rs121917971	-	0.9994	5,18
938	MAT	GABRB1	AD	HT	MISS	c.1588G>A	VUS	-	-	-	0.9988	5,43
940	PAT	GRIN2A	AD	HT	SYN	c.157C>T	VUS	-	rs55885632	0.000004	0.5891	4,25
951	ND	DEPDC5	AD	HT	CNV_ DEL	c.1604G>A	-	-	-	-	-	-
957	ND	KCNT1	AD	HT	MISS	g.(?_67243157)_(6 7647704_?)del	VUS	LP	-	-	0.9995	4,87
965	ND	MECP2	XL	HT	NON	c.1016T>A	P	-	-	-	0.9971	5,80
975	ND	PRRT2	AD	HT	FS	c.803C>T	VUS	P	rs587778771/r s772994486	-	-	3,90
981	ND	HCN1	AD	HT	MISS	c.824G>A	VUS	-	-	-	0.9944	5,37
996	PAT	NPRL2	AD	HT	MISS	c.775A>G	VUS	-	-	-	0.999	5,17
1008	MAT	KCNT1	AD	HT	INDEL	c.837C>T	VUS	-	-	-	-	4,46
1030	ND	FGF12	AD	HT	MISS	c.949G>A	VUS	P	rs886039903	-	0.998	5,51
1038	ND	SCN8A	AD	HT	MISS	c.2912_2913delins AT	VUS	-	-	-	0.9896	4,96
1049	ND	CNTNAP2	AR	HT	MISS	c.900C>A	VUS	-	rs1340170810	-	0.9992	5,95
1068	ND	KCNC1	AD	HT	MISS	c.718G>A	VUS	-	-	-	0.9987	4,41
1073	ND	EFHC1	AD	HT	MISS	c.1228C>G	VUS	-	rs762271322	0.000044	0.9956	4,02
1078	ND	CASR	AD	HT	MISS	c.53A>T	VUS	-	-	-	0.9919	4,98
1099	PAT	HECW2	AD	HT	MISS	c.469T>C	VUS	-	-	-	0.9983	5,01
1119	PAT	SYN1	XL	HT	MISS	c.3924A>T	VUS	-	-	-	0.9993	4,88
1126	ND	SLC6A1	AD	HT	MISS	c.1421G>T	VUS	-	-	-	0.9985	4,21
1127	ND	CDKL5	XL	HT	MISS	c.2526G>C	LP	-	-	-	0.974	5,98

1129	ND	PRRT2	AD	HT	FS	c.3274T>C	VUS	P/LP	rs587778771/r s772994486	-	-	3,90
1173	ND	SCN10A	AD	HT	FS	g.(?_6366971)_(63 67083_?)del	VUS	VUS	rs747321219	0.000076	-	3,41
1173	ND	SCN10A	AD	HT	MISS	g.(?_6704579)_(67 04676_?)del	VUS	-	rs774337248	0.000012	0.9869	4,14
1191	ND	KCNQ5	AD	HT	MISS	g.(?_67291192)_(6 7291284_?)del	VUS	-	rs748704876	-	0.9996	5,84

Panel Defectos de la Morfogénesis Cerebral - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
48	DN	PAFAH1B1	AD	HT	CNV_ DEL	g.(?_2583433)_(25 85146_?)del	-	-	-	-	-	-
69	MAT	DCX	XLD	HT	MISS	c.191C>T	LP	LP	rs761786389	0.000033	0.8931	-1,84
86	DN	PIK3R2	AD	HT	MISS	c.1117G>A	LP	P	rs587776934	-	0.9989	3,69
112	PAT	RELN	AR	HT C	MISS	c.10112G>T	LP	-	-	-	0.9861	4,98
112	MAT	RELN	AR	HT C	MISS	c.8809G>A	VUS	-	rs750491016	0.000004	0.9973	5,89
118	MAT	KNL1	AR	HT C	SYN	c.1599A>G	VUS	LP	rs979186313	0.000016	0.209	-2,41
118	DN	KNL1	AR	HT C	MISS	c.6427G>T	LP	LP	-	-	0.995	3,08
121	DN	PAFAH1B1	AD	HT	CNV_ DEL	g.(?_2541532)_(25 41639_?)del	-	-	-	-	-	-
223	PAT	TSEN54	AR	HT C	MISS	c.371G>T	LP	LP	rs774157225	0.000012	0.9595	5,30

ANEXOS

223	MAT	TSEN54	AR	HT C	MISS	c.919G>T	LP	P/LP	rs113994152	0.000903	0.9749	5,14
223	MAT	TSEN54	AR	HT C	MISS	c.277T>C	LP	P	rs113994151	-	0.9526	1,79
331	ND	SRPX2	-	HE	MISS	c.559C>T	LP	-	-	-	0.9993	5,61
422	DN	PIK3R2	AD	HT	MISS	c.1117G>A	LP	P	rs587776934	-	0.9989	3,69
430	DN	SHH	AD	HT	FS	c.143delT	P	LP	-	-	-	4,78
467	TRANS	TUBGCP6	AR	HO	SPL	c.4315+2_4315+3delTG	P	LP	-	-	-	4,12
480	ND	DCX	XLD	HE	MISS	c.266T>C	LP	-	-	-	0.9983	4,21
503	MAT	TSEN2	AR	HT C	MISS	c.1037A>G	LP	LP	rs1477347690	-	0.9984	5,39
503	PAT	TSEN2	AR	HT C	FS	c.353_354del	P	LP	rs755246924	0.000024	-	4,92
517	DN	KIF11	AD	HT	FS	c.2971_2972insT	P	LP	-	-	-	-3,05
581	DN	TUBB2A	AD	HT	MISS	c.743C>T	LP	P/LP	rs2808001	0.000034	0.9771	4,97
723	DN	EFTUD2	AD	HT	NON	c.259C>T	P	-	-	-	0.9983	6,00
927	TRANS	ADGRG1	AR	HO	NON	c.1504C>T	P	-	rs746634404	0.000012	0.9983	4,90
995	DN	EFTUD2	AD	HT	DEL	c.2562-2_2562-1delAG	LP	-	-	-	-	6,06

Panel Defectos de la Morfogénesis Cerebral - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
----------	------------------	-----	---	-------	------	----------	------	---------	-------	--------	------	------

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

111	ND	<i>ARFGEF2</i>	AR	HT	MISS	c.625G>A	VUS	VUS	rs28937880	0.00178	0.9992	6,06
119	MAT	<i>CASK</i>	XL	HT	CNV_ DUP	g.(?_41524505)_(41 524730_?)dup	-	-	-	-	-	-
119	MAT	<i>CASK</i>	XL	HT	CNV_ DUP	g.(?_41530656)_(41 530808_?)dup	-	-	-	-	-	-
119	MAT	<i>CASK</i>	XL	HT	CNV_ DUP	g.(?_41519667)_(41 519839_?)dup	-	-	-	-	-	-
122	ND	<i>MED17</i>	AR	HT	MISS	c.602A>G	VUS	-	rs770618400	0.000008	0.9979	5,51
216	ND	<i>ZIC2</i>	AD	HT	NONFS	c.1392_1403del	VUS	-	rs124150271 8	-	-	-2,77
323	ND	<i>CASC5</i>	AR	HT	SPL	c.75+6A>G	VUS	VUS	rs201311057	0.000876	0.8046	
323	ND	<i>CASC5</i>	AR	HT	SYN	c.5142G>C	VUS	-	-	0.000437	0.3756	-5,43
439	MAT	<i>PIK3CA</i>	-	HT	MISS	c.2530T>C	VUS	-	rs756890248	0.000008	0.8934	5,38
607	ND	<i>TUBB2B</i>	AD	HT	MISS	c.728C>T	VUS	VUS	-	-	0.9734	4,20
678	PAT	<i>CCND2</i>	AD	HT	MISS	c.553A>T	VUS	-	-	-	0.9869	4,79
710	ND	<i>DCX</i>	XL, XLR	HT	MISS	c.829C>T	LP	LP	rs587783568	-	0.9993	4,74
718	DN	<i>SNAP29</i>	AR	HT	CNV_ DEL	g.(?_21213348)_(21 242174_?)del	-	-	-	-	-	-
982	ND	<i>FLNA</i>	XL, XLR	HT	MISS	c.5959G>C	VUS	-	-	-	0.9979	5,42

Panel Discapacidad Intelectual - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
1102	DN	ADNP	AD	HT	FS	c.56_57delTG	LP	-	-	-	-	6,17
1128	MAT	L1CAM	XL, XLR	HE	SPL	c.2750-2A>G	P	-	-	-	0.9937	5,17

Panel Discapacidad Intelectual - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Proteína	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
615	MADRE NO PORTADOR A FALTA PADRE	AUTS2	AD	HT	DEL	p.(His535_Thr542del)	VUS	-	-	-	-	5,73
646	ND	GRIN2B	AD	HT	MISS	p.Gly1026Ser	VUS	VUS	rs201963596	0.000227	0.9664	5,49
646	ND	GRIN2B	AD	HT	MISS	p.Gly1002Arg	VUS	-	rs761281000	0.000019	0.999	5,50
772	ND	GRIK2	AR	HT C	CNV _DEL	-	-	-	-	-	-	-
772	ND	GRIK2	AR	HT C	CNV _DEL	-	-	-	-	-	-	-
789	MAT	ZMYM3	XL	HE	MISS	p.Glu692Lys	VUS	-	-	-	0.9643	4,70
840	ND	HIVEP2	AD	HT	MISS	p.Asp2012Glu	VUS	-	-	-	0.9824	5,21
1045	ND	GNB1	AD	HT	MISS	p.Ala73Thr	VUS	-	-	-	0.9826	5,66
1100	PAT	SETD5	AD	HT	MISS	p.Ser1223Leu	VUS	-	rs373191662	-	0.9976	5,75

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

1152	PAT	SYNGAP1	AD	HT	MISS	p.Lys444Gln	VUS	-	-	-	-
1180	ND	DDX3X	XLD	HT	FS	p.(Ser492Alafs*4)	P	-	-	-	5,22
1194	ND	AHDC1	AD	HT	DEL	p.Asp1554_Leu1556de	VUS	-	-	-	5,33

Panel de Enfermedades Neuromusculares - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
72	MAT Y HNA	TTN	AD, AR	HT C	FS	c.12411delT	LP	-	-	-	-	-3,24
72	PAT Y HNA	TTN	AD, AR	HT C	FS	c.105110_105111de elCC	LP	-	-	-	-	2,99
81	TRANS	CHRNE	AD, AR	HO	MISS	c.583G>C	LP	-	rs774425374	-	0.9889	4,62
101	TRANS	GYG1	AR	HO	MISS	c.46G>C	LP	-	rs200947378	0.000004	0.9962	5,29
144	TRANS	TCAP	AR	HO	NON	c.255C>A	P	-	-	-	0.9945	4,55
146	ISODISO MIA MAT	TTN	AR	HE	FS	c.38661_38665del	LP	LP	-	-	-	3,67
195	DN	TAZ	XLR	HE	MISS	c.527A>G	LP	-	-	-	0.9973	5,54
197	DN	KBTBD13	AD	HT	MISS	c.290T>C	LP	VUS/LP	rs767384093	0.000074	0.9945	4,36
211	TRANS	CAPN3	AR	HT C	FS	c.1962delC	P	LP	-	-	-	5,05
211	TRANS	CAPN3	AR	HT C	MISS	c.2120A>G	LP	P/LP	rs200379491	0.000151	0.9986	5,01
255	DN	MYH7	AD	HT	MISS	c.1606G>A	LP	-	-	-	0.9994	4,86

ANEXOS

282	TRANS	<i>SIGMAR1</i>	AR	HO	CNV _DE L	g.(?_34635615)_(3 4635855_?)del	-	-	-	-	-	-
299	PAT	<i>TTN</i>	AD, AR	HT C	NON	c.3034C>T	P	LP	rs397517547	0.000004	0.9973	3,03
299	MAT	<i>TTN</i>	AD, AR	HT C	SPL	c.106531+1G>A	P	LP	rs760915007	0.000005	0.9916	5,61
325	TRANS	<i>SYNE1</i>	AR	HO	SPL	c.26095-1G>T	P	-	-	-	0.9945	4,54
343	MAT	<i>TTN</i>	AD, AR	HT C	NON	c.33064C>T	P	-	rs747806875	0.000004	0.9939	4,29
343	PAT	<i>TTN</i>	AD, AR	HT C	MISS	c.102941G>A	LP	-	-	-	0.9483	5,60
358	MAT	<i>SGCA</i>	AR	HT C	MISS	c.724G>T	LP	LP	rs200166783	0.000004	0.9835	-0,28
358	PAT	<i>SGCA</i>	AR	HT C	MISS	c.739G>A	LP	P/LP	rs143570936	0.000112	0.9987	3,85
361	TRANS	<i>SH3TC2</i>	AR	HO	NON	c.3325C>T	P	P	rs80338934	0.000039	0.9696	1,66
373	TRANS	<i>IGHMBP2</i>	AR	HT C	MISS	c.181G>A	LP	LP/VUS	rs105751894 3	-	0.9993	3,63
373	TRANS	<i>IGHMBP2</i>	AR	HT C	MISS	c.1327C>T	LP	LP	rs751549678	0.000012	0.9994	4,92
431	PAT	<i>DPAGT1</i>	AR	HT C	MISS	c.1150C>G	LP	-	-	-	0.9759	1,45
431	MAT	<i>DPAGT1</i>	AR	HT C	MISS	c.574G>C	LP	-	rs768464558	0.000004	0.9994	5,63
529	DN	<i>MPZ</i>	AD	HT	SPL	c.369C>T	LP	-	-	-	0.99	4,76
543	TRANS	<i>SGCG</i>	AR	HO	MISS	c.848G>A	LP	LP	rs104894422	0.000004	0.995	5,41
565	DN	<i>COL6A3</i>	AD, AR	HT	SPL	c.6210+5G>A	LP	-	-	-	0.9417	4,70
635	MAT	<i>SH3TC2</i>	AR	HT C	NON	c.2860C>T	P	P	rs80338933	0.000748	0.9964	4,13
635	PAT	<i>SH3TC2</i>	AR	HT C	FS	c.2640delC	P	LP	-	-	-	6,16

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

637	TRANS Y HNO PORTAD OR	HINT1	AR	HO	MISS	c.110G>C	LP	P	rs149782619	0.00026	0.9914	-0,94
766	DN	MFN2	AD, AR	HT	MISS	c.326A>G	LP	VUS	-	-	0.999	5,63
798	ND	DMD	XL	HE	MISS	c.9622A>G	LP	-	-	-	0.9991	5,21
800	ND	GJB1	XL	HE	MISS	c.547C>T	LP	LP	rs863224471	-	0.9992	4,99
850	ND	DMD	XL	HE	SPL	c.9563+1G>A	P	P	rs886043989	-	0.9948	4,91
876	DN	KBTBD13	AD	HT	MISS	c.244G>A	LP	P	rs130341120 9	0.000009	0.9982	3,66
880	DN	DMD	XL	HT	FS	c.5697dupA	P	P	-	-	-	6,06
908	DN	DNM2	AD, AR	HT	MISS	c.1856C>T	LP	P/LP	rs121909095	-	0.9992	4,92
988	TRANS Y HNO PORTAD OR	SGCG	AR	HO	FS	c.525delT	P	P	rs786204786 /rs11942837 47	0.000056	-	4,60
1203	ND	DMD	XL	HE	CNV _DE L	g.(?_32404402)_ (32503241_?)del	-	-	-	-	-	-

Panel de Enfermedades Neuromusculares - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Proteína	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
----------	------------------	-----	---	-------	------	----------	------	---------	-------	--------	------	------

ANEXOS

10	PAT	MYH7	AD	HT	MISS	c.4421C>A	VUS	-	-	-	0.9985	5,27
35	ND	SCN4A	AD	HT	MISS	c.4774A>G	LP	P	rs80338962	-	0.9953	3,91
50	PAT Y HNO	COL6A1	AD, AR	HT	FS	c.2166_2167in sC	P	-	-	-	-	4,97
133	ND	COL6A1	AD	HT	MISS	c.868G>A	P	P	rs121912939	-	0.9992	4,58
185	PAT	RYR1	AR	HT	MISS	c.2709C>G	LP	-	rs100763740 5	0.000008	0.9812	2,97
209	PAT	COL6A2	AD, AR	HT	NON	c.1806C>A	P	LP	rs751987553	-	0.9844	4,51
249	MAT	MYH2	AD, AR	HT	MISS	c.4205G>A	VUS	-	rs781252325	0.000016	0.9995	5,03
280	ND	REEP1	AD	HT	MISS	c.349G>C	VUS	-	-	-	0.9975	5,93
283	ND	RYR1	AD, AR	HT	SPL	c.10347+1G>A	P	LP	rs111436401	0.000004	0.9918	2,94
303	ND	CAPN3	AD	HT	FS	c.2361_2362in sTCAT	P	-	-	-	-	-
326	MAT NO, FALTA PAT	REEP1	AD	HT	MISS	c.164C>T	VUS	-	-	-	0.9959	5,42
338	MAT NO, FALTA PAT, HNOS NO PORTAD OES DN?;	CHRN1	AD	HT	MISS	c.309C>G	VUS	-	rs370657868	0.000004	0.9891	-2,02
349	MAT	GDAP1	AR	HT	NON	c.487C>T	P	P	rs104894077	0.000076	0.9984	5,23

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

375	PAT	<i>INF2</i>	AD	HT	FS	c.1580_1581in sC	LP	-	-	0.000021	-	3,71
387	ND	<i>CLCN1</i>	AD, AR	HT	MISS	c.2234A>G	VUS	VUS	rs144612641	0.000426	0.9967	4,34
465	ND	<i>LAMA2</i>	AR	HT	MISS	c.149C>T	LP	LP	rs191899712	0.00004	0.9991	5,44
465	ND	<i>LAMA2</i>	AR	HT	SPL	C.8075+1G>A	P	LP	rs105540785 7	-	0.9955	5,42
507	ND	<i>RYR1</i>	AD, AR	HT	NON	c.4837C>T	P	LP	rs133237189 1	-	0.9983	3,89
507	ND	<i>RYR1</i>	AD, AR	HT	MISS	c.13672C>T	LP	LP	rs771741606	0.000004	0.978	1,49
507	ND	<i>RYR1</i>	AD, AR	HT	MISS	c.7027G>A	LP	LP	rs536596969	0.000024	0.9937	3,69
509	ND	<i>ACTA1</i>	AR	HT	MISS	c.529A>G	LP	LP	-	-	0.9495	4,58
509	ND	<i>ACTA1</i>	AR	HT	SPL	C.809-2A>T	P	P	rs130190245	0.000004	0.9929	4,33
596	ND	<i>COL12A 1</i>	AD, AR	HT	MISS	c.8215T>C	VUS	-	rs376478905	0.000008	0.9888	5,62
596	ND	<i>COL12A 1</i>	AD, AR	HT	NON	c.6995G>A	P	-	rs971696892	-	0.9964	5,76
620	ND	<i>STIM1</i>	AD	HT	MISS	c.247G>T	VUS	-	rs134460816 2	0.000004	0.9979	5,76
630	ND	<i>TTN</i>	AR	HT	NON	c.38737G>T	P	LP	rs767120669	0.000008	0.5786	3,74
630	ND	<i>TTN</i>	AR	HT	FS	c.87019_87022 del	P	LP	-	-	-	4,61
749	ND	<i>DST</i>	AR	HT	SYN	c.822A>G	VUS	-	-	-	0.8517	4,99
749	ND	<i>DST</i>	AR	HT	MISS	c.4777A>C	VUS	-	rs202229877	0.000008	0.8349	2,91
790	ND	<i>COL6A2</i>	AD, AR	HT	MISS	c.875G>A	LP	-	-	-	0.9966	4,26
793	MAT	<i>TRAPPC 11</i>	AR	HT	SPL	C.1568-1G>A	P	LP	-	-	0.995	5,89

793	MAT	TRAPPC11	AR	HT	MISS	c.2147C>G	VUS	CONFLICT	rs143990563	0.000577	0.9969	5,27
900	PAT	SLC52A2	AR	HT	FS	c.595delG	LP	-	-	-	-	4,34
1155	ND	DMD	XL	HT	FS	c.3125delA	LP	-	-	-	-	5,12
1216	ND	FKRP	AR	HT	MISS	c.545A>G	VUS	P/LP	rs543163491	0.000082	0.9956	4,55
1216	ND	FKRP	AR	HT	MISS	c.898G>A	VUS	VUS	rs563033008	0.000032	0.9977	3,12
1216	ND	FKRP	AR	HT	MISS	c.822C>G	VUS	LB	rs77138370	-	0.5933	1,80

Panel de Trastornos del Movimiento - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
138	PAT OLIGOSINTOMATICO, PORTADOR HE	FLNA	XL	HT	MISS	c.6370G>A	VUS	VUS	-	0.000066	0.9979	4,78
154	PAT	SGCE	AD	HT	FS	c.600_601insG	P	-	-	-	-	5,66
288	DN	KCND3	AD	HT	MISS	c.1111G>A	LP	P/LP	rs1057521793	-	0.9993	4,83
376	DN	ITPR1	AD	HT	MISS	c.722G>A	LP	-	-	-	0.9954	4,96
511	TRANS	HPCA	AR	HO	MISS	c.25C>T	LP	-	-	-	0.9986	4,30
580	TRANS	ATM	AR	HT C	NON	c.652C>T	P	P	-	-	0.9964	4,51
580	TRANS	ATM	AR	HT C	NON	c.8484delA	P	P	-	-	0.9964	4,51

1182	TRANS	SACS	AR	HO	CNV _DEL	g.(?_23942516)_(23942651_?)del	-	-	-	-	-	-
------	-------	------	----	----	-------------	--	---	---	---	---	---	---

Panel de Trastornos del Movimiento - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
18	ND	TNXB	AR	HT	MISS	c.11533G>A	VUS	-	-	-	-	-
18	ND	TNXB	AR	HT	MISS	c.7889G>A	VUS	-	-	-	-	-
57	MAT	COL6A1	AD	HT	MISS	c.2147C>T	VUS	VUS	rs755589190	0.000015	0.996	2,75
57	PAT	COL1A2	AD	HT	MISS	c.1502C>G	VUS	-	rs1466730398	0.000008	0.3637	-1.99
132	ND	CAMTA1	AD	HT	MISS	c.1277A>G	VUS	-	rs774923440	0.000004	0.9969	5,02
214	ND	PLOD1	AR	HO	NON FS	c.2169_2171del	VUS	-	rs13106920621	0.000004	-	5,69
290	ND	FBN1	AD	HT	MISS	c.5927A>G	LP	VUS	-	-	0.9993	6,07
398	ND	COL6A3	AD, AR	HT	MISS	c.1576G>A	VUS	-	rs780262157	0.000008	0.9984	5,60
486	ND	ANO3	AD	HT	MISS	c.1787C>A	VUS	-	-	-	0.9958	5,88
636	ND	ANO10	AR	HO	MISS	c.1715C>A	VUS	VUS	rs759026322	0.000012	0.9888	4,46
733	ND	TNXB	AD	HT	MISS	c.877G>T	VUS	-	-	-	-	3,95
736	ND	CACNA1A	AD	HT	MISS	c.2849C>G	VUS	-	-	-	0.6534	3,54
785	MAT	KIF1A	AD	HT	MISS	c.206C>T	VUS	P/LP	rs786200949	-	0.9987	4,79

915	PADRE Y TIOS PORTAD ORES PERO NO SE CONOCE CLINICA	SLC2A1	AD	HT	SYN	c.672C>T	VUS	-	-	-	0.9327	5,27
962	ND	FREM1	AD, AR	HT	CNV _DEL	g.(?_14737343)_(1 4869025_?)del	-	-	-	-	-	-
1147	ND	ITPR1	AD	HT	MISS	c.5797C>T	VUS	-	-	-	0.9989	4,95

Panel de Ciliopatías - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
134	PAT	CPLANE1	AR	HT C	FS	c.493del	LP	P	rs606231259	0.000146	-	0,51
134	MAT	CPLANE1	AR	HT C	MISS	c.3379T>G	LP	-	rs776423792	0.000012	0.9964	5,64
208	TRANS	WDR19	AR	HO	MISS	c.3533G>A	LP	VUS/LP/ P	rs79436363	0.000055	0.9995	5,53
225	MAT	BBS10	AR	HT C	FS	c.1677delC	P	P	-	0.000004	-	4,39
225	PAT	BBS10	AR	HT C	MISS	c.989T>G	LP	-	-	-	0.9969	4,99
298	TRANS	BBS12	AR	HO	MISS	c.65T>C	LP	P	rs565073445	0.000012	0.9985	5,20
339	TRANS	BBS1	AR	HO	FS	c.118delT	P	-	rs149035182 9	0.000008	-	5,31
355	MAT	CEP290	AR	HT C	FS	c.4028delA	P	P	rs121328641 71	0.000024	-	5,57

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

355	PAT	CEP290	AR	HT C	FS	c.1512_1515del	P	P	rs886043303	-	-	3,57
570	TRANS	CSPP1	AR	HO	FS	c.2364_2365del	LP	-	rs137509009 5	0.000009	-	5,17
583	TRANS	TTC8	AR	HO	CNV _DE L	g.(?_89343613)_(89 343804_?)del	-	-	-	-	-	-
688	MAT	BBS10	AR	HT C	FS	c.1272delA	LP	-	-	-	-	1,34
688	PAT	BBS10	AR	HT C	FS	c.271dupT	P	P	rs549625604	0.000579	-	4,30
828	TRANS	BBS7	AR	HO	FS	c.712_715delAGAG	P	P	rs760165634	0.000052	-	5,20

Panel de Ciliopatías - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
812	MAT	OFD1	XLR	HE	MISS	c.2305A>G	VUS	-	rs759933503	0.000011	0.9411	1,25
838	ND	WDR19	AR	HT	MISS	c.1477G>C	VUS	P	rs587777349	0.000004	0.9951	5,50
838	ND	WDR19	AR	HT	SPL	c.2421G>T	VUS	-	-	-	0.9954	5,69
949	ND	LZTR1	AD	HT	SPL	c.1353+1G>A	P	-	-	-	0.9721	3,69

9.38.3. NEUROEXOMA

NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
153	MOS	GRIN2A	AD	HT	MISS	c.1928C>A	LP	LP	-	-	0.9981	5,27
696	DN	NEDD4L	AD	HT	MISS	c.2153T>C	LP	-	-	-	0.9938	5,94
958	MAT	MED17	AD	HT C	MISS	c.1927A>G	LP	-	rs761959231	0.000044	0.9893	5,68
958	PAT	MED17	AD	HT C	FS	c.386delC	LP	-	-	-	-	5,44
978	TRANS	TMEM70	AR	HO	SPL	c.317-2A>G	P	P	rs183973249	0.000072	0.9947	5,35
1010	DN	ACTA1	AD	HT	MISS	c.614C>A	VUS	-	-	-	0.9772	4,40
1055	DN	PTPN11	AD	HT	MISS	c.1391G>C	LP	P	rs121918469	-	0.9981	5,05
1085	DN	KCNQ2	AD	HT	MISS	c.1658G>A	LP	P	rs118192234	-	0.9995	4,99
1134	DN	DYNC1H1	AD	HT	MISS	c.10354G>A	LP	VUS	-	-	0.9992	5,86
1209	DN	COL6A1	AD	HT	MISS	c.850G>A	P	P	rs121912938	-	0,9991	3,59

NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Variante	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
932	ND	ARFGEF2	AR	HT	MISS	c.1419G>T	VUS	-	-	-	0.9974	0,73
997	MAT	HIVEP2	AD	HT	NON	c.7289C>A	P	-	-	-	0.9942	4,38

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

999	ND	<i>SLC6A1</i>	AD	HT	DEL	c.1157_1159del TCT	VUS	-	-	-	-	5,57
1013	PAT	<i>TALDO1</i>	AR	HT	MISS	c.656A>G	VUS	-	rs932808360	0.000016	0.9814	2,60
1013	PAT	<i>TALDO1</i>	AR	HT	MISS	c.181C>G	VUS	VUS	rs149640294	0.000323	0.9877	4,39
1015	ND	<i>CACNA1D</i>	AD	HT	SPL	c.2979-1G>C	P	-	-	-	0.9953	5,65
1021	ND	<i>LMNB1</i>	AD	HT	FS	c.1025_1026del AA	LP	-	-	-	-	5,74
1101	PAT	<i>PURA</i>	AD	HT	DUP	c.907_909dupC AG	VUS	-	-	0.000004	-	5,73
1136	ND	<i>CHD1</i>	AD	HT	MISS	c.4289A>G	VUS	-	-	-	0.9987	5,18
1158	PAT	<i>SCN8A</i>	AD	HT	MISS	c.2389A>G	VUS	-	rs148226849 5	-	0.9574	4,23
1170	PAT	<i>PPP2R1A</i>	AD	HT	MISS	c.1013A>G	VUS	-	rs100049650 2	0.4984	-	4,38
1192	ND	<i>EPB41L1</i>	AD	HT	CNV _DE L	g.(?_34785756) (34785988_?)del	-	-	-	-	-	-
1199	ND	<i>TPM2</i>	AD	HT	MISS	c.635A>G	VUS	-	-	-	0.9982	5,01
1214	ND	<i>STXBP1</i>	AD	HT	MISS	c.875G>A	VUS	P	rs796053361	-	0.9995	4,75
1215	ND	<i>CDK5RAP2</i>	AR	HT	MISS	c.1245G>T	VUS	-	-	-	0.9881	1,72
1215	ND	<i>CDK5RAP2</i>	AR	HT	FS	c.1246delG	LP	-	-	-	-	5,78
1223	PAT	<i>NALCN</i>	AD	HT	MISS	c.2507C>G	VUS	-	-	-	0.9986	5,61

9.38.4. ANÁLISIS POR PANEL INDIVIDUAL Y REANÁLISIS POR NEUROEXOMA

Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico positivo

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Proteína	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
38	TRANS	PCCA	AR	HT C	SPL	-	VUS	-	-	-	0.8494	5.03
38	TRANS	PCCA	AR	HT C	MISS	p.Ala310Gly	VUS	-	rs146927771	0.000705	0.9915	5.55
41	PAT	KCNT1	AD	HT C	MISS	p.Arg262Gln	LP	LP	-	-	0.9995	4,87
41	DN	KCNT1	AD	HT C	SPL	-	P	-	-	-	0.9908	5,24
67	TRANS	SLC13A5	AR	HT C	MISS	p.Pro505Leu	VUS	-	rs936922976	-	0.9988	5,15
67	TRANS	SLC13A5	AR	HT C	FS	p.Leu504fs	P	LP	rs121177337 2	-	-	5,15
76	DN	SYNGAP 1	AD	HT	NON	p.Glu422*	LP	-	-	-	-	4,80
109	DN	KCNB1	AD	HT	MISS	p.Trp369Cys	LP	-	-	-	0.9906	6,02
164	DN	SLC9A6	XLD	HT	NON	p.Ser534*	P	-	-	-	0.9949	5,36
165	DN	TCF4	AD	HT	MISS	p.Arg671Trp	LP	P	-	-	0.9992	3,92
201	DN	DNM1	AD	HT	MISS	p.Gly38Ser	LP	LP	rs113169202 5	-	0.9986	1,83
289	DN	CSNK2B	AD	HT	NON	p.Gln42*	LP	-	-	-	-	-
315	DN	SLC16A2	XLD	HE	FS	p.(Glu34*)	LP	-	-	-	-	-
317	DN	GNAO1	AD	HT	MISS	p.Gly203Arg	VUS	P	rs587777057	-	0.9992	5,28
351	ND	SBF2	AR	HO	SPL	p.Ala794Ser	VUS	-	-	-	0.9897	5,63

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

363	PAT Y HNA	<i>TSC2</i>	AD	HT	MISS	p.Glu1213Lys	VUS	-	-	-	0.9991	3,74
392	DN	11/NE	<i>GNAO1</i>	AD	HT	SPL	-	P	-	-	0.9946	5,29
393	MAT	<i>LIPT1</i>	AR	HT C	MISS	p.Ser71Phe	LP	P	rs767568897	0.000088	0.998	4,91
393	PAT	<i>LIPT1</i>	AR	HT C	MISS	p.Arg98Trp	LP	-	rs137973334	0.000004	0.9989	4,00
499	PAT	<i>ALMS1</i>	AR	HT C	NON	p.Ser2529*	P	-	-	-	0.9961	4,47
499	MAT	<i>ALMS1</i>	AR	HT C	NON	p.Gln3673*	P	-	-	-	0.9929	5,09
571	DN	<i>KCNQ2</i>	AD	HT	MISS	p.Arg210His	LP	P	rs886041262	-	0.9995	4,05
684	DN	<i>GNAO1</i>	AD	HT	MISS	p.Glu237Lys	LP	LP	rs106479453 3	-	0.9993	5,29
704	DN	<i>KCNQ2</i>	AD	HT	MISS	p.Ile278Thr	LP	LP	rs105752372 8	-	0.9971	4,00
774	TRANS	<i>FLVCR1</i>	AR	HO	MISS	p.Ala241Thr	LP	P	rs267606819	-	0.9989	5,21
906	MAT	<i>POLR3A</i>	AR	HT C	SPL	-	P	-	-	-	0.9938	5,49
906	PAT	<i>POLR3A</i>	AR	HT C	SPL	-	LP	VUS/LP	rs201314157	0.000107	0.6128	2,87
912	DN	<i>STAG1</i>	AD	HT	NON	p.Leu762*	P	-	-	-	0.993	6,01
990	PAT	<i>PRKRA</i>	AR	HT C	MISS	p.Pro222Leu	LP	P	rs121434410	0.000099	0.965	3,93
990	MAT	<i>PRKRA</i>	AR	HT C	MISS	p.Pro153Ser	LP	-	-	-	0.9989	4,77
991	TRANS	<i>ATPAF2</i>	AR	HO	SPL	-	P	LP	rs147941728	0.000028	0.9884	4,63
991	TRANS	<i>NAGS</i>	AR	HO	MISS	p.Val239Ile	LP	-	rs143427275	0.000044	0.9888	3,85
1024	TRANS	<i>HEXA</i>	AR	HO	MISS	p.Arg178His	LP	P	rs28941770	0.000048	0.9994	5,44
1082	MAT	<i>LRPPRC</i>	AR	HT C	SYN	p.Ile560Leu	VUS	VUS	rs144826521	0.000685	0.9776	5,88
1082	PAT	<i>LRPPRC</i>	AR	HT C	SPL	-	VUS	-	rs568212653	0.000048	0.9076	5,41

1156	DN	SLC6A1	AD	HT	MISS	p.Phe385Leu	LP	-	-	-	0,9972	5,57
------	----	--------	----	----	------	-------------	----	---	---	---	--------	------

Panel Individual vs NeuroExoma - Pacientes con Diagnóstico NO concluyente

Paciente	Estudio familiar	Gen	H	Alelo	Tipo	Proteína	ACMG	ClinVar	dbSNP	GnomAD	DANN	GERP
42	ND	MT01	AR	HT	MISS	p.Arg464Cys	VUS	-	rs1459252796	0.000004	0.9995	5.48
126	ND	GFM2	AR	HT	MISS	p.Glu642Ala	VUS	-	-	-	0.8395	4.53
126	ND	GFM2	AR	HT	MISS	p.Phe641Tyr	VUS	-	rs76339998	-	0.6827	3,31
150	MAT Y HNO	KCNQ2	AD	HT	MISS	p.Ala747Val	VUS	-	rs1244838198	0.000008	0.9822	3,14
150	PAT Y HNO	SCN3A	AD	HT	MISS	p.Leu1938Ser	VUS	-	rs1304082055	0.000004	0.8581	6,03
151	ND	ZEB2	AD	HT	NONFS	p.Gly1068_Ser 1069del	LP	VUS	-	-	-	5,51
203	ND	PDHA1	XL	HT	FS	p.Leu193fs	LP	-	-	-	-	5,28
204	MAT	HCN1	AD	HT	MISS	p.Gly44Arg	VUS	-	rs1421975269	-	0.9973	3,23
253	ND	ZNF41	XL	HEMY	MISS	p.Phe686Ser	VUS	-	-	-	0.9986	3,69
278	ND	ARID1B	AD	HT	SPL		P	-	-	-	0.9949	5,56
374	ND	COL4A1	AD	HT	MISS	p.Gly969Glu	LP	-	-	-	0.9982	
391	ND	ATAD3C	-	HT	CNV-DEL	-	-	-	-	-	-	-
391	ND	ATAD3C	-	HT	CNV-DEL	-	-	-	-	-	-	-
464	ND	WAC	AD	HT	MISS	p.Pro528Leu	VUS	-	rs772980873	-	0.9988	5,51

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

535	ND	<i>ATP13A2</i>	AR	HT	MISS	p.Val105Ile	VUS	-	rs119066730 1	0.000008	0.9669	3,45
535	ND	<i>ATP13A2</i>	AR	HT	MISS	p.Ala249Val	VUS	VUS	rs145515028	0.000738	0.9017	-8,40
705	MADRE NO PORTAD ORA FALTA PADRE	<i>SLC6A1</i>	AD	HT	MISS	p.Thr349Ala	VUS	-	-	-	0.9977	5,25
1041	ND	<i>ALG1</i>	AR	HT	MISS	p.Arg276Trp	VUS	LP	rs151173406	0.000008	0.9989	4,36
1081	PAT	<i>BSCL2</i>	AD	HT	MISS	p.Gln14Lys	VUS	-	-	-	0.9931	5,05
1084	PAT, TIO, ABUELA	<i>MTOR</i>	AD	HT	MISS	p.Lys42Asn	VUS	-	-	-	0.9973	4,78

9.38.5. TABLA DE GENES CON REFSEQ CORRESPONDIENTE

<i>GENE</i>	<i>REFSEQ</i>	<i>GENE</i>	<i>REFSEQ</i>	<i>GENE</i>	<i>REFSEQ</i>	<i>GENE</i>	<i>REFSEQ</i>
<i>ABCC8</i>	NC_000011.9	<i>DCX</i>	NM_000555.3	<i>KCNT1</i>	NM_020822.3	<i>SCN1A</i>	NM_001165963.1
<i>ABCC8</i>	NM_001287174.1	<i>DDX3X</i>	NM_001356.4	<i>KIF11</i>	NM_004523.4	<i>SCN1A</i>	NC_000002.11
<i>ACAD9</i>	NM_014049.5	<i>DEPDC5</i>	NM_014662.5	<i>KIF1A</i>	NM_004321.7	<i>SCN1B</i>	NM_199037.5
<i>ACTA1</i>	NM_001100.3	<i>DEPDC5</i>	NC_000022.11	<i>KNL1</i>	NM_170589.4	<i>SCN2A</i>	NC_000002.11
<i>ADCK4</i>	NM_024876.4	<i>DHDDS</i>	NM_024887.3	<i>L1CAM</i>	NM_000425.4	<i>SCN2A</i>	NM_021007.2
<i>ADGRG1</i>	NM_001145771.2	<i>DMD</i>	NM_004006.2	<i>LAMA2</i>	NM_000426.3	<i>SCN3A</i>	NM_006922.4
<i>ADNP</i>	NM_001282531.1	<i>DMD</i>	NC_000023.10	<i>LETM1</i>	NM_012318.2	<i>SCN4A</i>	NM_000334.4
<i>ADSL</i>	NM_000026.3	<i>DNM1</i>	NM_004408.3	<i>LIPT1</i>	NM_001204830.1	<i>SCN8A</i>	NM_014191.3
<i>AGK</i>	NM_018238.3	<i>DNM1L</i>	NM_005690.4	<i>LMNB1</i>	NM_005573.3	<i>SCN9A</i>	NM_002977.3
<i>AGL</i>	NM_000642.2	<i>DNM2</i>	NM_001005360.2	<i>LRPPRC</i>	NM_133259.3	<i>SCN9A</i>	NC_000002.11
<i>AHDC1</i>	NM_001029882.3	<i>DPAGT1</i>	NM_001382.4	<i>LZTR1</i>	NM_006767.3	<i>SERPINI1</i>	NM_005025.4
<i>AKT2</i>	NM_001626.6	<i>DST</i>	NM_001723.5	<i>MCCC2</i>	NM_022132.5	<i>SETBP1</i>	NM_015559.3
<i>ALDOB</i>	NM_000035.3	<i>DYNC1H1</i>	NM_001376.4	<i>MECP2</i>	NM_004992.3	<i>SETD5</i>	NM_001080517.2
<i>ALG1</i>	NM_019109.4	<i>EARS2</i>	NM_001083614.1	<i>MED17</i>	NM_004268.5	<i>SGCA</i>	NM_000023.4
<i>ALMS1</i>	NM_015120.4	<i>EFHC1</i>	NM_018100.3	<i>MEF2C</i>	NM_001193347.1	<i>SGCE</i>	NM_003919.3
<i>AMT</i>	NM_000481.3	<i>EFTUD2</i>	NM_004247.3	<i>MFN2</i>	NM_014874.3	<i>SGCG</i>	NM_000231.2
<i>ANO10</i>	NM_018075.3	<i>EPB41L1</i>	NC_000020.10	<i>MOCOS</i>	NM_017947.3	<i>SGSH</i>	NM_000199.3
<i>ANO3</i>	NM_031418.2	<i>ETFDH</i>	NM_004453.4	<i>MOCOS2</i>	NM_176806.3	<i>SH3TC2</i>	NM_024577.3

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

<i>ARFGF2</i>	NM_006420.3	<i>FARS2</i>	NM_006567.3	<i>MPZ</i>	NM_000530.8	<i>SHH</i>	NM_000193.3
<i>ARHGEF15</i>	NM_025014.1	<i>FARS2</i>	NC_000006.11	<i>MTO1</i>	NM_012123.3	<i>SIGMAR1</i>	NC_000009.11
<i>ARHGEF9</i>	NM_015185.2	<i>FBN1</i>	NM_000138.4	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	<i>SLC12A5</i>	NM_020708.4
<i>ARID1B</i>	NM_020732.3	<i>FBXL4</i>	NM_012160.3	<i>MYH2</i>	NM_017534.6	<i>SLC13A5</i>	NM_177550.4
<i>ARX</i>	NM_139058.3	<i>FGF12</i>	NM_021032.4	<i>MYH7</i>	NM_000257.4	<i>SLC16A2</i>	NM_006517.4
<i>ASPM</i>	NM_018136.5	<i>FKRP</i>	NM_001039885.2	<i>NAGLU</i>	NM_000263.3	<i>SLC17A5</i>	NM_012434.4
<i>ATM</i>	NM_000051.3	<i>FLAD1</i>	NM_025207.4	<i>NAGS</i>	NM_153006.2	<i>SLC22A5</i>	NM_003060.4
<i>ATP13A2</i>	NM_022089.3	<i>FLNA</i>	NM_001456.3	<i>NALCN</i>	NM_052867.2	<i>SLC2A1</i>	NM_006516.2
<i>ATPAF2</i>	NM_145691.3	<i>FLVCR1</i>	NM_014053.3	<i>NDUFAF2</i>	NM_174889.5	<i>SLC35A2</i>	NM_001282651.1
<i>AUTS2</i>	NM_015570.3	<i>FMO3</i>	NM_001002294.2	<i>NDUFB11</i>	NM_019056.6	<i>SLC37A4</i>	NM_001164278.1
<i>BBS1</i>	NM_024649.4	<i>FOXG1</i>	NM_005249.5	<i>NDUFS2</i>	NM_004550.4	<i>SLC52A2</i>	NM_001253815.1
<i>BBS10</i>	NM_024685.4	<i>FOXRED1</i>	NM_017547.3	<i>NEDD4L</i>	NM_015277.5	<i>SLC6A1</i>	NM_003042.3
<i>BBS12</i>	NM_152618.3	<i>FREM1</i>	NM_144966.5	<i>NPRL2</i>	NM_006545.4	<i>SLC6A8</i>	NM_005629.4
<i>BBS7</i>	NM_176824.2	<i>GAA</i>	NM_000152.4	<i>NPRL3</i>	NM_001077350.2	<i>SLC9A6</i>	NM_001042537.1
<i>BCS1L</i>	NM_004328.4	<i>GABBR2</i>	NM_005458.7	<i>OFD1</i>	NM_003611.2	<i>SMARCA1</i>	NM_001282874.1
<i>BRAT1</i>	NM_152743.3	<i>GABRB1</i>	NM_000812.3	<i>OPA1</i>	NM_130834.2	<i>SNAP29</i>	NC_000022.11
<i>BSCL2</i>	NM_032667.6	<i>GABRG2</i>	NM_198903.2	<i>PACS1</i>	NM_018026.3	<i>SPG7</i>	NM_003119.3
<i>C12orf65</i>	NM_152269.4	<i>GALT</i>	NM_000155.4	<i>PAFAH1B1</i>	NC_000017.10	<i>SPTAN1</i>	NM_001130438.2
<i>CACNA1A</i>	NM_023035.2	<i>GBA</i>	NM_000157.3	<i>PAH</i>	NM_000277.1	<i>SRGAP2</i>	NC_000001.10
<i>CACNA1D</i>	NM_000720.3	<i>GDAP1</i>	NM_018972.3	<i>PCCA</i>	NM_000282.4	<i>SRPX2</i>	NM_014467.3

<i>CACNA1H</i>	NM_021098.3	<i>GFM1</i>	NM_024996.5	<i>PCDH19</i>	NM_020766.2	<i>STAG1</i>	NM_005862.2
<i>CACNA2D1</i>	NM_000722.3	<i>GFM2</i>	NM_001281302.1	<i>PDHA1</i>	NM_000284.3	<i>STIM1</i>	NM_003156.3
<i>CAMTA1</i>	NM_015215.3	<i>GJB1</i>	NM_000166.6	<i>PDX1</i>	NM_000209.3	<i>STXBP1</i>	NM_003165.3
<i>CAPN3</i>	NM_000070.2	<i>GLDC</i>	NM_000170.2	<i>PET100</i>	NM_001171155.1	<i>SUCLA2</i>	NM_003850.2
<i>CASC5</i>	NM_170589.4	<i>GLUD1</i>	NM_005271.5	<i>PEX12</i>	NM_000286.2	<i>SYN1</i>	NM_006950.3
<i>CASK</i>	NC_000023.10	<i>GNAO1</i>	NM_138736.2	<i>PHKA2</i>	NM_000292.2	<i>SYNE1</i>	NM_182961.3
<i>CASR</i>	NM_001178065.1	<i>GNAO1</i>	NM_020988.2	<i>PHKB</i>	NM_000293.2	<i>SYNGAP1</i>	NM_006772.2
<i>CCND2</i>	NM_001759.4	<i>GNB1</i>	NM_001282539.1	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	<i>SYNJ1</i>	NM_003895.3
<i>CDH15</i>	NM_004933.2	<i>GNE</i>	NM_005476.3	<i>PIK3R2</i>	NM_005027.4	<i>TALDO1</i>	NM_006755.1
<i>CDK5RAP2</i>	NM_018249.5	<i>GNPTAB</i>	NM_024312.5	<i>PLA2G6</i>	NM_003560.2	<i>TAZ</i>	NM_000116.5
<i>CDKL5</i>	NM_003159.2	<i>GPHN</i>	NC_000014.8	<i>PLOD1</i>	NM_000302.4	<i>TBC1D24</i>	NM_020705.2
<i>CEL</i>	NM_001807.5	<i>GPHN</i>	NM_020806.4	<i>PNKP</i>	NM_007254.2	<i>TCAP</i>	NM_003673.3
<i>CEP290</i>	NM_025114.3	<i>GRIA4</i>	NM_001077243.2	<i>PNPT1</i>	NM_033109.5	<i>TCF4</i>	NM_001243226.2
<i>CHD1</i>	NM_001270.2	<i>GRIK2</i>	NC_000006.11	<i>POLG2</i>	NM_007215.4	<i>TCN2</i>	NC_000022.10
<i>CHRNA4</i>	NM_000744.6	<i>GRIN2A</i>	NM_000833.3	<i>POLR3A</i>	NM_007055.3	<i>TMEM70</i>	NM_017866.5
<i>CHRNB1</i>	NM_000747.2	<i>GRIN2B</i>	NM_000834.3	<i>POLR3B</i>	NM_018082.6	<i>TNXB</i>	NM_019105.6
<i>CHRNE</i>	NM_000080.3	<i>GYG1</i>	NM_004130.2	<i>POLRMT</i>	NM_005035.3	<i>TPM2</i>	NM_213674.1
<i>CLCN1</i>	NM_000083.2	<i>HCN1</i>	NM_021072.3	<i>PPP2R1A</i>	NM_014225.5	<i>TPP1</i>	NM_000391.4
<i>CLCN2</i>	NM_004366.6	<i>HECW2</i>	NM_020760.2	<i>PPT1</i>	NM_000310.3	<i>TRAPPC11</i>	NM_021942.5
<i>CLCN4</i>	NM_001830.3	<i>HEXA</i>	NM_000520.6	<i>PRKRA</i>	NM_003690.4	<i>TREX1</i>	NM_033629.6

SOFIA ISABEL BARBOSA SOUSA GOUVEIA

<i>CLN6</i>	NM_017882.3	<i>HINT1</i>	NM_005340.6	<i>PRODH</i>	NM_016335.4	<i>TSC2</i>	NM_000548.4
<i>CNTNAP2</i>	NM_014141.5	<i>HIVEP2</i>	NM_006734.3	<i>PROSC</i>	NM_007198.3	<i>TSEN2</i>	NM_025265.3
<i>COL12A1</i>	NM_004370.6	<i>HNRNPU</i>	NM_004501.3	<i>PRRT2</i>	NC_000016.10	<i>TSEN54</i>	NM_207346.2
<i>COL1A2</i>	NM_000089.3	<i>HPCA</i>	NM_002143.2	<i>PRRT2</i>	NM_145239.3	<i>TSFM</i>	NM_005726.6
<i>COL4A1</i>	NM_001845.6	<i>HPRT1</i>	NM_000194.3	<i>PTPN11</i>	NM_002834.3	<i>TTC8</i>	NC_000014.9
<i>COL6A1</i>	NM_001848.2	<i>HSD17B4</i>	NM_000414.4	<i>PURA</i>	NM_005859.4	<i>TTN</i>	NM_001267550.2
<i>COL6A2</i>	NM_001849.3	<i>IDH2</i>	NM_002168.3	<i>PYGL</i>	NM_002863.4	<i>TUBB2A</i>	NM_001069.2
<i>COL6A3</i>	NM_004369.3	<i>IGHMBP2</i>	NM_002180.2	<i>RBFOX1</i>	NC_000016.9	<i>TUBB2B</i>	NM_178012.5
<i>COQ4</i>	NM_016035.4	<i>IL1RAPL1</i>	NC_000023.10	<i>RBFOX1</i>	NM_145891.2	<i>TUBGCP6</i>	NM_020461.3
<i>COX15</i>	NM_004376.5	<i>INF2</i>	NM_001031714.3	<i>REEP1</i>	NM_022912.2	<i>UMPS</i>	NM_000373.4
<i>CPA6</i>	NM_020361.4	<i>ITPR1</i>	NM_002222.5	<i>RELN</i>	NM_005045.3	<i>UPB1</i>	NM_016327.2
<i>CPLANE1</i>	NM_023073.3	<i>JRK</i>	NM_003724.3	<i>RFT1</i>	NM_052859.3	<i>WAC</i>	NM_016628.4
<i>CPS1</i>	NM_001875.4	<i>KBTBD13</i>	NM_001101362.2	<i>RHOBTB2</i>	NM_001160036.1	<i>WDR19</i>	NM_025132.3
<i>CSNK2B</i>	NM_001320.6	<i>KCNA2</i>	NM_004974.3	<i>RNASEH2B</i>	NM_024570.3	<i>YARS</i>	NM_003680.3
<i>CSPP1</i>	NM_024790.6	<i>KCNB1</i>	NM_004975.3	<i>RRM2B</i>	NM_015713.4	<i>ZEB2</i>	NM_014795.3
<i>CTBP1</i>	NM_001328.2	<i>KCNC1</i>	NM_001112741.1	<i>RYR1</i>	NM_000540.2	<i>ZIC2</i>	NM_007129.3
<i>CTSA</i>	NM_000308.3	<i>KCND3</i>	NM_004980.4	<i>RYR3</i>	NM_001036.5	<i>ZMYM3</i>	NM_005096.3
<i>CUL4B</i>	NM_003588.3	<i>KCNQ2</i>	NM_172107.3	<i>SACS</i>	NC_000013.10	<i>ZMYND11</i>	NM_006624.5
<i>CYC1</i>	NM_001916.4	<i>KCNQ3</i>	NM_004519.4	<i>SBF2</i>	NM_030962.3	<i>ZNF41</i>	NM_001324155.1
<i>DARS2</i>	NM_018122.4	<i>KCNQ5</i>	NM_001160133.1	<i>SCN10A</i>	NM_006514.3		

9.38.6. DISEÑO PANELES GENÉTICOS

Panel de Hipo/Hiperglucemia

ABCC8 AKT2 ALMS1 APPL1 ASXL2 BLK BSCL2 CAPN10 CDKAL1 CEL DIS3L2 ENPP1 GCGR GCK GLIS3 GLUD1 GPD2 HADH HMGA1 HNF1A HNF1B HNF4A IGF2BP2 IL6 INS INSR IRS1 IRS2 KCNJ11 KLF11 LEP LEPR LIPC LMNA MAFA MAPK8IP1 MC4R MEN1 MPI MTNR1B NEUROD1 NSD1 PAX4 PCSK1 PDX1 PGM1 PLAGL1 PLIN1 POMC PPARG PPP1R3A PTPN1 PYGL RETN SH2B1 SIM1 SLC16A1 SLC2A1 SLC2A2 SLC30A8 SLC5A1 TCF7L2 UBE3B UCP2 UMOD WFS1 ZFP57



Panel de Defectos en el Metabolismo Intermediario

ABCD4 ACADM ACADS ACADSB ACADVL ACAT1 ACAT2 ACSF3 ADA ADK ADSL AGL AGXT AGXT2 AHCY ALDH4A1 ALDH5A1 ALDH6A1 ALDOB AMT APRT ARG1 ASL ASS1 AUH BCKDHA BCKDHB BTD C2ORF25 C7ORF10 CBS CD320 CLPB CLPX CPS1 CPT1A CPT2 CTH D2HGDH DBT DHTKD1 DLD DNAJC12 DNAJC19 DPYD DPYS ETFB ETFDH ETHE1 FAH FBP1 FH FMO3 FTCD G6PC GALE GALK1 GALT GBE1 GCDH GCH1 GCSH GGT1 GLDC GLUL GLYCKT GNMT GPHN GRHPR GSTZ1 GYS2 HADHA HADHB HAL HCFC1 HGD HLCS HMGCL HMGCS2 HOGA1 HPD HPRT1 HSD17B10 HTRA2 IDH2 IVD L2HGDH LMBRD1 MAT1A MCCC1 MCCC2 MCEE MDH1 MLYCD MMAA MMAB MMACHC MMADHC MOCOS MOCS1 MOCS2 MTHFR MTR MTRR MUT NAGS NT5C3A OAT OGDH OPA3 OTC OXCT1 PAH PC PCBD1 PCCA PCCB PCK1 PCK2 PEPD PGM1 PHKA2 PHKB PHKG2 PKLR PMM2 PNP PRODH PRPS1 PTS PYGL QDPR SERAC1 SLC1A1 SLC22A5 SLC25A1 SLC25A13 SLC25A15 SLC25A20 SLC2A2 SLC37A4 SLC46A1 SLC52A1 SLC6A19 SLC6A9 SUCLA2 SUCLG1 SUOX TAT TAZ TCN2 TIMM50 UMPS UPB1 XDH

Panel de Enfermedades Mitocondriales

AARS2 ABCB11 ACAD8 ACAD9 ACO2 ADCK1 ADCK2 ADCK3 ADCK4 ADCK5 ADSL AFG3L2 AGK AIFM1 AKR1B15 APOPT1 APTX ATAD1 ATAD3A ATP5A1 ATP5B ATP5C1 ATP5D ATP5E ATP5F1 ATP5F1D ATP5G1 ATP5G2 ATP5G3 ATP5O ATPAF1 ATPAF2 BCS1L BOLA3 C10ORF2 C12ORF65 C19ORF12 C1QBP CA5A CARS2 CCDC88A CEP89 CHCHD10 CLPB CLPP COA5 COA6 COA7 COQ10A COQ10B COQ2 COQ3 COQ4 COQ5 COQ6 COQ7 COQ9 COX10 COX11 COX14 COX15 COX16 COX17 COX18 COX19 COX4I1 COX4I2 COX6A1 COX6A2 COX6B1 COX6B2 COX7B COX8A CPS1 CYC1 CYCS DARS2 DEAF1 DGUOK DLAT DLD DNA2 DNAJC19 DNM1L E4F1 EARS2 ECHS1 ELAC2 ETHE1 FAM36A FARS2 FARSB FASTKD2 FBXL4 FDX1L FH FLAD1 FOXRED1 GARS GFER GFM1 GFM2 GLRX5 GOT2 GPT2 GTPBP3 GYG2 HARS2 HCCS HIBCH HSD17B10 HSD17B4 HSPD1 HSPE1 HTRA2 IARS IARS2 IBA57 ISCA1 ISCA2 ISCU ITPA KARS LARS2 LETM1 LGI1 LIAS LIPT1 LIPT2 LONP1 LRP4 LRPPRC LYRM4 LYRM7 MARS2 MDH2 MECP2 MFF MFN1 MFN2 MGME1 MICU1 MIPEP UQCC2 MPV17 MRPL12 MRPL3 MRPL44 MRPS16 MRPS22 MRPS23 MRPS34 MRPS7 MTCH1 MTERF1 MTFMT MTHFD1L MTO1 MTPAP NADK2 NARS2 NAT8L NAXE NDUFA1 NDUFA10 NDUFA11 NDUFA12 NDUFA13 NDUFA2 NDUFA3 NDUFA4 NDUFA4L2 NDUFA5 NDUFA9 NDUF11 NDUF12 NDUF13 NDUF14 NDUF15 NDUF16 NDUF17 NDUF18 NDUF19 NDUF20 NDUF21 NDUF22 NDUF23 NDUF24 NDUF25 NDUF26 NDUF27 NDUF28 NDUF29 NDUF30 NDUF31 NDUF32 NDUF33 NDUF34 NDUF35 NDUF36 NDUF37 NDUF38 NDUF39 NDUF40 NDUF41 NDUF42 NDUF43 NDUF44 NDUF45 NDUF46 NDUF47 NDUF48 NDUF49 NDUF50 NDUF51 NDUF52 NDUF53 NDUF54 NDUF55 NDUF56 NDUF57 NDUF58 NDUFV1 NDUFV2 NDUFV3 NFS1 NFU1 NUBPL OPA1 OPA3 PARS2 PC PCK2 PDHA1 PDHA2 PDHB PDHX PDK3 PDP1 PDP2 PDSS1 PDSS2 PET100 PET117 PGAP2 PIGN PMPCB PNPLA4 PNPLA8 PNPT1 POLG POLG2 POLRMT PTC1 PUS1 QRSL1 RANBP2 RARS2 RERE RMND1 RNASEH1 RPIA RRM2B RTN4IP1 SARS SARS2 SCO1 SCO2 SDHA SDHAF1 SDHAF2 SDHB SDHC SDHD SERAC1 SFXN4 SLC19A3 SLC25A12 SLC25A19 SLC25A26 SLC25A3 SLC25A4 SLC25A42 SLC25A46 SLC52A2 SLC6A8 SLC6A9 SPG20 SPG7 SUCLA2 SUCLG1 SURF1 TACO1 TANGO2 TARS2 TAZ TAZ TBCD TBCE TFAM TIMM8A TK2 TKT TMEM126A TMEM126B TMEM70 TOP3A TPK1 TRAK1 TRIT1 TRMT10C TRMT5 TRMU TRNT1 TSFM TTC19 TUBB TUBB6 TUFM TXN2 TYMP UPB1 UQCC3 UQCR10 UQCR11 UQCRB UQCRC1 UQCRC2 UQCRFS1 UQCRH UQCRHL UQCRQ VAC14 VARS2 VDAC1 VDAC2 WARS2 YARS2 YME1L1

Panel de Defectos en Moléculas Complejas y Leucodistrofias

AARS AARS2 ABCD1 ABCD3 ABHD12 ABHD5 ACAA1 ACER3 ACOX1 ADAR AGA AGPS AIFM1 AIMP1 AIMP2 AKR1D1 ALDH3A2 AMACR APOPT1 ARSA ARSB ASAH1 ASPA ATP13A2 ATRN BCAP31 C11ORF73 C19ORF12 CLCN2 CLN3 CLN5 CLN6 CLN8 CNTNAP1 COL4A1 CP CRAT CSF1R CTBP1 CTC1 CTSA CTSD CTSF CYP27A1 CYP7B1 DARS DHCR24 DHCR7 DNAJC5 DYM EBP EIF2B1 EIF2B2 EIF2B3 EIF2B4 EIF2B5 EPRS ERAL1 FA2H FAM126A FDFT1 FUCA1 GAA GALT GALNS GBA GBE=GBE1 GFAP GJC2 GLA GLB1 GM2A GNE GNPAT GNPTAB GNPTG GNS GPHN GRN GUSB HEPACAM HEXA HEXB HGSNAT HSD17B4 HSD3B7 HSPD1 HTRA1 HYAL1 IBA57 IDS IDUA IFIH1 ITPA KCNT1 KCTD7 LAMP2 LIPA LMNB1 MAG MAN2B1 MANBA MCOLN1 MFSD8 MLC1 MSMO1 MVK NAGA NAGLU NALCN NANS NDUFA2 NEU1 NKX6-2 NOTCH3 NPC1 NPC2 NPL NSDHL NUBPL PEX1 PEX10 PEX11B PEX12 PEX13 PEX14 PEX16 PEX19 PEX2 PEX26 PEX3 PEX5 PEX6 PEX7 PHYH PLEKHG2 PLP1 PMM2 POLR1A POLR1C POLR3A POLR3B PPT1 PSAP PYCR2 RAB33B RARS REPS1 RNASEH2A RNASEH2B RNASEH2C RNASET2 SAMHD1 SC5D SCARB2 SCP2 SGSH SIGMAR1 SLC16A2 SLC17A5 SLC1A4 SLC25A12 SMPD1 SNORD118 SOX10 SPTAN1 SUMF1 TBCD TMEM106B TPP1 TREX1 TUBB4A UBTF UFM1 VPS11 VPS33A

**Panel de Epilepsia**

AARS ABAT ACMSD ADAM22 ADGRV1 ALDH7A1 ALG13 AMT AP3B2 ARHGEF15 ARHGEF9 ARV1 ARX ASAH1 ATAD1 ATP13A2 ATP6V1A BRAT1 BRWD3 BSCL2 CACNA1A CACNA1D CACNA1H CACNA2D1 CACNA2D2 CACNB4 CAD CARS2 CASR CCDC88A CDKL5 CERS1 CHD2 CHRNA2 CHRNA4 CHRN2 CLCN2 CLCN4 CLCN6 CLN3 CLN5 CLN6 CLN8 CNPY3 CNTN2 CNTNAP2 CPA6 CPLX1 CSNK1G1 CSNK2B CSTB CTSD CTSF CUX2 CYFIP2 DCX DEAF1 DENND5A DEPDC5 DHDDS DHFR DIAPH1 DNAJC5 DNM1 DNMT3A DOCK7 EEF1A2 EFHC1 EPM2A ERBB4 EXT2 FAS FDFT1 FGF12 FLNA FOLR1 FOXG1 FRRS1L GABBR2 GABRA1 GABRA5 GABRB1 GABRB2 GABRB3 GABRD GABRG2 GCSH GLDC GLRA1 GLRB GNAO1 GOSR2 GPAA1 GPHN GRIA3 GRIA4 GRIN1 GRIN2A GRIN2B GRIN2D GRN GUF1 HCN1 HCN2 HCN4

HECW2 HNRNPH1 HNRNPU HSD17B10 ICK IER3IP1 IL1RAPL1 IQSEC1 IQSEC2 IRF2BPL ITPA KCC2 KCNA2 KCNB1 KCNC1 KCNH1 KCNH5 KCNJ10 KCNMA1 KCNQ2 KCNQ3 KCNQ5 KCNT1 KCNT2 KCTD7 KIAA2022 KIF5A LAMC3 LGI1 LMNB2 LNPB MAGI2 MAPK10 MBD5 MDH2 MECP2 MEF2C MFSD8 MTOR NACC1 NALCN NAPB NDP NECAP1 NEDD4L NHLRC1 NIPA2 NPRL2 NPRL3 NRXN1 NTNG1 NTRK2 NUS1 PACS2 PAK1 PCDH19 PCDH7 PCK1 PIGA PIGC PIGG PIGH PIGO PIGQ PIGS PLCB1 PNKP PNPO POLG PPP3CA PPT1 PRDM8 PRICKLE1 PRICKLE2 PRNP PROSC PRRT2 PTEN QARS RARS2 RBFOX1 RBFOX3 RFT1 RHOTB2 ROGDI RORA RORB RYR3 SACS SARS SCA2 SCARB2 SCN10A SCN1A SCN1B SCN2A SCN3A SCN7A SCN8A SCN9A SERPINI1 SETBP1 SIK1 SLC12A5 SLC13A5 SLC19A3 SLC1A2 SLC25A12 SLC25A22 SLC2A1 SLC35A2 SLC6A1 SLC6A5 SMARCA1 SMC1A SNAP25 SPTAN1 SRGAP2 SRGAP2C SRPX2 ST3GAL3 ST3GAL5 STX1B STXBP1 STYXL1 SUCO SYN1 SYNGAP1 SYNJ1 SZT2 TBC1D24 TBCD TBL1XR1 TCF4 TPP1 TRAK1 TRAPPC6B TRIM8 TSC2 TUBB TUBB2A TUBB2B TUBB3 TUBB4A UBA5 UBE3A VARS VPS13A WARS2 WDR45 WDR45B WWOX YWHAG ZEB2

Panel de Defectos en la Morfogénesis Cerebral

KIAA1109 ACTB ACTG1 ADGRG1 AGMO AHI1 AKT3 AMPD2 ANKLE2 ARFGF2 ARHGEF2 ARX ASNS ASPM ATAD3A ATAD3B ATAD3C ATR BRAT1 BRF1 BRWD3 CASC5 CASK CCM1 CCND2 CDK5 CDK5RAP2 CDK6 CDON CENPE CENPJ CENPJ CEP135 CEP152 CEP63 CHD7 CHMP1A CIT CLP1 CNTNAP2 COL18A1 COL4A1 COL4A2 CTNNA2 CTU2 DCHS1 DCX DEPDC5 DIAPH1 DISP1 DLL1 DYNC1H1 EFTUD2 EML1 EMX2 EOMES ERMARD EXOSC3 EXOSC9 EZH2 FAT4 FDFT1 FGF8 FIG4 FKRP FKTN FLNA FOXP2 FRMD4A GAS1 GLI2 GLUL GNAQ GPSM2 HESX1 IER3IP1 ISPD JNK3 KAT6A KATNB1 KCNMA1 KIAA1279 KIF11 KIF14 KIF1A KIF2A KIF5C KPTN L1CAM LAMB1 LAMC3 LARGE LNPB LRP2 MAP18 MAP2 MCPH1 MED12 MED17 MED20 MEF2C MFSD2A MIR17HG MTOR MYCN NCAPD2 NCAPD3 NCAPH NDE1 NEDD4L NHEJ1 NIN NPRL3 NRXN1 NSDHL OCLN OFD1 OPHN1 OTX2 PAFAH1B1 PAX3 PCDH12 PHC1 PIK3CA PIK3R2 PLAA PNKP POMGNT1 POMT1 POMT2 PPP1R15B PRICKLE1 PRUNE1 PTCH1 PYCR2 RAB18 RAB3GAP1 RAB3GAP2 RARS2 RBBP8 RELN RTTN SARS SASS6 SEPSECS SHH SIX3 SLC12A6 SLC1A4 SLC25A19 SNAP29 SOX2 SOX3 SPATA5 SRGAP2C

STIL STRADA TBC1D23 TBC1D7 TBCD TDGF1 TGIF1 TMTC3 TRAIP TRAPPC12 TRAPPC6B TRIM36 TRMT10A TSEN15
 TSEN2 TSEN34 TSEN54 TUBA1A TUBA8 TUBB TUBB2A TUBB2B TUBB3 TUBB4A TUBG1 TUBGCP6 UPF3B VARS VLDLR
 VPS53 VRK1 WDFY3 WDR62 WDR73 XRCC4 ZIC2 ZNF148 ZNF335 ZNF592



Panel de Discapacidad Intelectual

ACSL4 ADAT3 ADNP AFF2 AHDC1 ALPK3 ANK3 ANKRD11 AP1S2 ARHGEF6 ARID1A ARID1B ARX ASH1L ATP6AP2
 ATRX BCL11B BRPF1 BRWD3 CACNG2 CAMK2A CAMK2B CASK CC2D1A CDH15 CHAMP1 CLCN4 CLIC2 CLTC
 COL4A3BP CRADD CRBN CTCF CTNNB1 CUL4B DDX3X DEAF1 DLG3 DOCK8 DPP6 DYNC1H1 DYRK1A EDC3 EEF1A2
 EIF2S3 ELP2 EPB41L1 FBXO11 FBXO31 FGD1 FMN2 FMR1 FRMPD4 FTSJ1 GATAD2B GDI1 GNB1 GNB5 GPT2 GRIA3
 GRIK2 GRIN1 GRIN2B HBA1 HCFC1 HDAC8 HERC2 HIVEP2 HNMT HNRNP2 HSD17B10 HUWE1 IGBP1 IL1RAPL1
 IMPA1 IQSEC2 KAT6A KDM5B KDM5C KIAA0442=AUTS2 KIAA2022 KIF1A KIF4A KIRREL3 KLHL15 KMT5B KPTN L1CAM
 LINGO1 LINS1 LMAN2L MAN1B1 MBD5 MBOAT7 MECP2 MED12 MED23 MEF2C METTL23 MID2 MRT4 MRT60 MYT1L
 NAA15 NDST1 NLGN4X NONO NSDHL NSUN2 OPHN1 OTUD6B PACS1 PAK1 PAK3 PGAP1 PGAP2 PHF6 PHF8 PHIP
 PIGG POGZ PPP2R1A PPP2R5D PQBP1 PRPS1 PRSS12 PURA PUS3 RAB39B RAB40AL RBMX RLIM RORA RP2 RPS6KA3
 SET SETBP1 SETD5 SHROOM4 SLC16A2 SLC45A1 SLC6A17 SLC9A6 SMARCA4 SMARCB1 SMS SOX11 SOX3 SRPX2
 ST3GAL3 STAG1 SYNGAP1 SYP TAF1 TAF2 TBL1XR1 TECR THOC2 TLK2 TNIK TRAPPC9 TRIP12 TSPAN7 TTI2 TUSC3
 UBE2A UPF3B USP27X USP9X WASHC4 ZBTB18 ZC3H14 ZDHHC15 ZDHHC9 ZMYM3 ZMYND11 ZNF41 ZNF674 ZNF711
 ZNF81

Panel de Enfermedades Neuromusculares

AARS ABHD12 ACADS ACADVL ACTA1 ADCY6 ADGRG6 ADSSL1 AEBP1 AGL AGRN AIFM1 ALDOA ALG14 ALG2 ALS2
AMACR AMPD1 ANO5 ANXA11 ARHGEF10 ASAH1 ASCC1 ATL1 ATL3 ATP2A1 ATP7A B3GALNT2 B3GNT2 BAG3 BICD2
BIN1 BSCL2 BVES C19ORF12 CACNA1S CAPN3 CASQ1 CAV3 CCDC174 CCDC78 CCT5 CFL2 CHAT CHCHD10 CHD7
CHKB CHRNA1 CHRNB1 CHRND CHRNE CHRNG CLCN1 CLN3 CNTN1 CNTNAP1 COL12A1 COL13A1 COL1A2 COL6A1
COL6A2 COL6A3 COL6A6 COLQ COX6A1 CPT2 CRYAB DAG1 DARS2 DCAF8 DES DGAT2 DHTKD1 DHX30 DMD DNA2
DNAJB2 DNAJB6 DNM2 DOK7 DPAGT1 DRP2 DST DYNC1H1 DYSF ECEL1 EGR2 EMD ERBB3 ERBB4 ERGIC1 ETFA ETFB
ETFDH FAM111B FBLN5 FBN2 FDX1L FGD4 FHL1 FIG4 FKRP FKTN FLAD1 FLNC GAA GAN GARS GBE1 GDAP1 GFER
GFPT1 GJB1 GLDN GLE1 GMPPB GNB4 GNE GOLGA2 GYG1 GYS1 GZF1 HADHA HADHB HARS HINT1 HINT3 HK1
HNRNPA1 HNRNPA2B1 HNRNPDL HOXD10 HRAS HSPB1 HSPB3 HSPB8 IBA57 IGHMBP2 IKBKAP INF2 INPP5K ISCU
ISPD ITGA7 JPH1 KARS KBTBD13 KIF1A KIF1B KIF5A KLC2 KLHL40 KLHL41 KY LAMA2 LAMB2 LAMP2 LARGE LAS1L
LDB3 LDHA LGI4 LIMS2 LITAF LMNA LMOD3 LRP4 LRSAM1 LTC4S MARS MATR3 MCM3AP MED25 MEGF10 MFN2
MICU1 MME MORC2 MPZ MSTO1 MTM1 MTMR14 MTMR2 MUSK MYBPC1 MYF6 MYH14 MYH2 MYH3 MYH7 MYH8
MYO18B MYO9A MYOT MYPN NAGLU NALCN NAPB NDRG1 NEB NEFH NEFL NEK1 NEK9 NGF NTRK1 OPA1 ORAI1
PABPN1 PDK3 PFKM PGAM2 PGK1 PHKA1 PHKB PIEZO2 PIP5K1C PLEC PLEKHG5 PMP22 PNPLA2 PNPLA6 PNPLA8
POGLUT1 POLG POMGNT1 POMGNT2 POMK POMT1 POMT2 PRPS1 PRX PTPLA PUS1 PYGM PYROXD1 RAB7A RAPSN
RBCK1 REEP1 RETREG1 RYR1 SBF1 SBF2 SCN10A SCN4A SCP2 SEPN1 SETX SGCA SGCB SGCD SGCG SH3TC2 SIGMAR1
SLC12A6 SLC18A3 SLC22A5 SLC25A3 SLC25A32 SLC25A42 SLC25A46 SLC3A1 SLC52A1 SLC52A2 SLC52A3 SLC5A7
SMCHD1 SNAP25 SOD1 SPEG SPG11 SPTBN4 SPTLC1 SPTLC2 SQSTM1 STAC3 STIM1 SURF1 SYNE1 SYNE2 SYT2
TARDBP TAZ TBCD TBCE TBCK TCAP TDP1 TFG TIA1 TK2 TMEM43 TMEM5 TNNI2 TNNT1 TNNT3 TNPO3 TNXB
TOR1AIP1 TOR1AIP2 TPM2 TPM3 TRAPPC11 TRIM2 TRIM32 TRIM54 TRIM63 TRIP4 TRPV4 TTN TTR UBA1 UNC80
VCP VMA21 VRK1 WARS WNK1 YARS YARS2 ZAK ZBTB42

Panel de Trastornos de Movimiento y Ataxias

AASS ABCB7 ABCD1 ABHD12 ACBD5 ACP33 ACTB ADAR ADCK3 ADCY5 ADD3 AFG3L2 ALDH18A1 ALS2 AMACR AMPD2
 ANO10 ANO3 AP4B1 AP4E1 AP4M1 AP4S1 AP5Z1 APOPT1 APTX ARG1 ARL6IP1 ARSA ARSI ARX ATCAY ATG5 ATL1
 ATM ATP13A2 ATP1A2 ATP1A3 ATP2B3 ATP8A2 AUH B4GALNT1 BCAP31 BEAN BSCL2 C10ORF2 C12ORF65
 C19ORF12 CA8 CACNA1A CACNA1B CACNA1G CACNB4 CAMTA1 CAPN1 CCDC88C CCT5 CHMP1B CIZ1 CLCN2 COASY
 COL6A3 COX20 CP CPT1C CWF19L1 CYP27A1 CYP2U1 CYP7B1 DARS2 DDC DDHD1 DDHD2 DHFR DLAT DLGAP4
 DNAJC3 DNM1L DNMT1 DOCK3 DSTYK DYNC1H1 DYT1 EBF3 EEF2 EIF2B5 ELOVL4 ELOVL5 ENTPD1 EPT1 ERLIN1
 ERLIN2 EXOSC3 FA2H FARS2 FAT2 FGF14 FLVCR1 FOXG1 FTL FUS GAD1 GAN GBA2 GCDH GCH1 GFAP GJC2 GLRA1
 GLRB GLRX5 GNAL GNAO1 GOSR2 GPR88 GRID2 GRIK2 GRIN2A GRM1 HACE1 HPCA HSPD1 IBA57 IFIH1 IRF2BPL
 ITPR1 KANK1 KCNA1 KCNA2 KCNC3 KCND3 KCNMA1 KCTD17 KIAA0196 KIAA0226 KIDINS220 KIF1A KIF1C KIF5A
 KLC2 KMT2B L1CAM MAG MAPT MARS MARS2 MECP2 MECP2 MME MR1 MRE11A MSTO1 MTPAP MVK NIPA1 NPC1
 NPC2 NT5C2 NUBPL OPA3 PANK2 PARK2 PARK7 PCNA PDE10A PDGFB PDHX PDYN PEX10 PEX16 PEX2 PGAP1 PIK3R5
 PINK1 PLA2G6 PLD3 PLEKHG2 PLP1 PMPCA PNKP PNPLA6 POLG POLR1A POLR3A POLR3B PRKCG PRKRA PRNP
 PRRT2 PUM1 RAB11B REEP1 REEP2 RNASEH2B RNF170 RNF216 ROBO1 RORA RTN2 SACS SAMD9L SARS SCN8A SCP2
 SCYL1 SDHAF1 SERAC1 SETX SGCE SIL1 SLC17A5 SLC18A2 SLC19A3 SLC1A3 SLC1A4 SLC2A1 SLC30A10 SLC30A9
 SLC33A1 SLC39A14 SLC52A2 SLC6A3 SLC9A1 SNX14 SPAST SPG11 SPG20 SPG7 SPR SPTAN1 SPTBN2 SQSTM1 STUB1
 SYNE1 SYT14 TACO1 TAF1 TDP1 TDP2 TECPR2 TELO2 TENM4 TFG TGM6 TH THAP1 TIMM8A TMEM240 TPK1 TPP1
 TRPC3 TSFM TTBK2 TTC19 TTPA TUBB4A UBA5 UBR4 UBTF UCHL1 UNC13A UROC1 USP8 VAC14 VAMP1 VLDLR
 VPS13D VPS37A VWA3B WARS2 WDR45 WDR45B WDR48 WDR81 WWOX ZFR ZFYVE26 ZFYVE27 ADAMTS2 ALDH18A1
 B4GALT7 BMP1 CHST14 COL1A1 COL1A2 COL3A1 COL4A1 COL5A1 COL5A2 CRTAP FBN1 FKBP10 FKBP14 FLNA
 HSPG2 IFITM5 KIF22 LEPRE1 PLOD1 PLOD2 PLOD3 PPIB SERPINF1 SERPINH1 SLC2A10 SLC39A13 SP7 TGFB1 TGFB2
 TGFB3 TMEM38B ZNF469

Panel de Ciliopatías

AHI1 ALMS1 ARL13B ARL3 ARL6 ARMC4 ARMC9 B9D1 B9D2 BBIP1 BBS1 BBS10 BBS12 BBS2 BBS4 BBS5 BBS7 BBS9
C2ORF86 C5ORF42 C8ORF37 CC2D2A CCDC28B CENPF CEP104 CEP120 CEP164 CEP290 CEP41 CSPP1 GLIS2
IFT27 IFT64 INPP5E INVS IQCB1 KIAA0556 KIAA0586 KIF14 KIF7 LZTFL1 MKKS MKS1 NEK8 NPHP1 NPHP3 NPHP4
OFD1 PDE6D PIBF1 RPGRIP1L SDCCAG8 SUFU TCTN1 TCTN2 TCTN3 TMEM107 TMEM138 TMEM216 TMEM231
TMEM237 TMEM67 TRAF3IP1 TRIM32 TTC21B TTC8 WDPCP WDR19 ZNF423



