



ACTUALIDAD

Perspectivas actuales sobre el diagnóstico genómico en pediatría

Guillermo Lay-Son R.^{1,2,*}, Luis León P.¹

1. Centro de Genética y Genómica, Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

2. Hospital Padre Hurtado, San Ramón, Santiago, Chile.

Recibido el 09 de noviembre de 2014, aceptado el 18 de noviembre de 2014.

PALABRAS CLAVE

Genómica, diagnóstico, *microarrays*, *next-generation sequencing*, exoma, genoma

KEYWORDS

Genomics, Diagnose, Microarrays, Next-Generation Sequencing, Exome, Genome

Resumen

El diagnóstico etiológico es un objetivo primordial para el manejo clínico de cada paciente. Algunos niños con cuadros clínicos complejos son objeto de una lista interminable de exámenes, lo que se ha denominado “odisea diagnóstica”, y que, sin embargo, muchas veces no deja resultados concluyentes. En los últimos años, estamos siendo testigos de una verdadera revolución de la medicina genómica con la incorporación al ámbito clínico de tecnologías que prometen aumentar la capacidad de hacer diagnóstico y disminuir los tiempos. Con énfasis en pediatría, se actualizan conceptos sobre las principales ventajas y limitaciones del diagnóstico genómico, en contraposición con las metodologías usuales.

Copyright © 2014 Sociedad Chilena de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Current perspectives on genome-based diagnostic tests in Pediatrics

Abstract

Etiological diagnosis is essential in the clinical management of individual patients. Some children with complex medical conditions are subjected to numerous testing, known as “diagnostic odyssey”, which often gives no conclusive results. In recent years, a revolution in genomic medicine is underway with the use of technologies that promise to increase the ability to make a diagnosis and reduce the time involved. The main advantages and limitations of genomic diagnosis, as opposed to usual methodologies are reviewed with an emphasis on Pediatrics.

Copyright © 2014 Sociedad Chilena de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY-NC ND Licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

* Autor para correspondencia:

Correo electrónico: glayson@udd.cl (Guillermo Lay-Son R.).

Introducción

Las enfermedades humanas tienen un componente genético reconocido, ya sea como factor causal (por ejemplo, trastornos monogénicos, de genes contiguos y cromosómicos) o como factor predisponente (por ejemplo, trastornos multifactoriales o complejos).

En el transcurso de la última década, con el impulso del Proyecto Genoma Humano (HGP, por sus siglas en inglés) hemos entrado en una revolución del diagnóstico molecular, donde han surgido avances tecnológicos que permiten analizar todo el genoma de una forma más rápida, de manera simultánea y con gran capacidad de resolución.

Es así como progresivamente, durante los últimos años, las técnicas genómicas comienzan a estar disponibles para uso clínico, y existe una amplia gama de ensayos moleculares específicos que ofrecen la confirmación etiológica para alrededor de 4000 condiciones monogénicas durante el año 2014¹. En este contexto, los ensayos basados en análisis genómicos ya están impactando en diferentes campos de la medicina, como la salud reproductiva, la oncología, el trasplante de órganos, la inmunología y las enfermedades infecciosas²⁻⁷.

El presente artículo pretende resumir las potencialidades del diagnóstico molecular desde el punto de vista genómico para trastornos genéticos constitucionales y sus posibles implicancias en la práctica clínica pediátrica.

La importancia del diagnóstico etiológico

En diversas circunstancias, muchos pacientes entran en una espiral de estudios en búsqueda de una etiología, lo que se ha llamado la "odisea diagnóstica"⁸. Un gran número de esos estudios pueden evitarse con un diagnóstico etiológico certero y oportuno. Sin embargo, esto último no siempre es factible, y se genera un retraso en el diagnóstico, lo que conlleva diversas consecuencias que exceden el ámbito clínico, afectando a las familias, y a la larga, sobrecargando el sistema de salud⁹⁻¹¹.

Aunque los trastornos genéticos, individualmente son considerados infrecuentes en la población general, es reconoci-

do que una significativa parte de los pacientes hospitalizados en unidades pediátricas complejas tienen enfermedades con un fuerte componente genético, con estadías recurrentes, más largas y con mayores gastos que los pacientes sin una condición preexistente¹²⁻¹⁴. En nuestro medio, las herramientas genéticas disponibles para estudios de estos pacientes son limitadas y no siempre son las más adecuadas para todos los casos. La experiencia reportada en otros países ha mostrado casos en que el aporte de la genómica ha permitido un diagnóstico etiológico insospechado, con potenciales implicancias en el manejo terapéutico¹⁵⁻¹⁸.

Estos datos no implican que en todos los casos se deba partir haciendo un estudio del genoma completo, pues nada puede reemplazar el juicio clínico basado en una anamnesis completa, que incluya una historia familiar adecuada, junto con un examen físico minucioso. Es así, como en el caso de un diagnóstico genético probable, uno debiera hacer el estudio mejor indicado para su confirmación, ya sea del ámbito citogenético (cariograma, hibridación fluorescente *in situ* o FISH específico) o molecular (secuenciación capilar Sanger del gen de interés, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* o MLPA específico). Sin embargo, si no se llega a corroborar un diagnóstico o bien en el caso de que el paciente tenga una condición no clasificable o con manifestaciones poco comunes, uno debiera plantearse la posibilidad de un estudio amplio del genoma y sin sesgos¹⁹.

Diagnóstico genético convencional y diagnóstico genómico

Buscando anomalías en la estructura del genoma

Diagnóstico convencional: cariotipo, FISH y MLPA

El estudio genético rutinario y básico desde la década de 1970 ha sido el cariotograma con bandeado GTG, el cual permite confirmar o descartar principalmente anomalías cromosómicas numéricas, y en menor medida, anomalías cromosómicas estructurales, que deben involucrar desde 5 a 10 millones de pares de bases (5-10 megabases; 5-10 Mb) para poder ser de-

Tabla 1. Comparación de los diferentes métodos de diagnóstico citogenético

	Nivel de resolución estándar	Cobertura	Anomalías detectables
Cariograma estándar con bandeado GTG	> 5-10 Mb	Genoma nuclear completo	Anomalías cromosómicas numéricas (poliploidías, aneuploidías); anomalías cromosómicas estructurales (inversiones, translocaciones, deleciones, etc.)
FISH metafase	> 2-5 Mb	Locus específico	Rearreglos genómicos submicroscópicos (microdeleciones, microduplicaciones, translocaciones)
FISH interfase	> 40-150 kb	Locus específico	Rearreglos genómicos submicroscópicos (microdeleciones, microduplicaciones, translocaciones)
MLPA	> 1 pb	Locus específico	Rearreglos genómicos muy pequeños (microdeleciones, microduplicaciones)
CMA	> 50 kb	Genoma nuclear completo	Rearreglos genómicos submicroscópicos (microdeleciones, microduplicaciones)

CMA: cariotipo molecular; FISH: hibridación *in situ* fluorescente; GTG: bandeado G por tripsina-giensa; MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*.

Unidades: kb: kilobases; Mb: megabases; pb: pares de bases.

tectables con resolución estándar de 400-550 bandas citogenéticas^{20,21}. En la década de 1990 emergieron técnicas citogenéticas moleculares que permitieron detectar microdeleciones o microduplicaciones cromosómicas, es decir, pérdidas o ganancias de material genético bajo el umbral de visibilidad en el microscopio óptico (tabla 1)^{21,22}. Aquí destaca la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que está disponible para un número limitado de patologías²⁰. Adicionalmente, se han incorporado al arsenal de herramientas diagnósticas algunas técnicas de biología molecular más finas en búsqueda de microdeleciones o microduplicaciones, entre las cuales destaca la de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)²³. A diferencia del cariotipo convencional, que es una mirada global a la información genética (genoma), tanto la técnica de FISH como la de MLPA y otras relacionadas están diseñadas para buscar de forma dirigida anomalías conocidas en ciertas regiones cromosómicas definidas; por lo tanto, se debe contar con una hipótesis diagnóstica.

Diagnóstico genómico: microarreglos cromosómicos o cariotipo molecular

En la últimas décadas, los grandes avances en biotecnología cimentaron las bases para el desarrollo de nuevos métodos que permitieron optimizar el limitado nivel de detección de las técnicas existentes. Por consiguiente, se pudo mejorar la baja capacidad diagnóstica de las técnicas citogenéticas convencionales y moleculares disponibles.

Es así como la técnica de la hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés)²⁴, desarrollada en la década de 1990, recobró relevancia de la mano del desarrollo de biochips, llevando al ámbito diagnóstico los microarreglos (*microarrays*). Los conceptos de microarreglos cromosómicos o cariotipo molecular (CMA) implican diferentes plataformas tecnológicas que permiten analizar o interrogar el genoma completo de un individuo en un chip²⁵. El uso de esta herramienta en el ámbito clínico permite la identificación de desequilibrios genómicos submicroscópicos con una resolución de hasta 50 kb, lo que equivale a cientos de veces mayor resolución que un cariotipo con bandeado GTG convencional^{26,27}. Los desequilibrios de tamaño submicroscópico y que resultan en pérdidas o ganancias de información genética sobre 1 kb son denominados variaciones en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés)^{28,29}. Los CNV son parte de la variabilidad interindividual, son relativamente comunes en la estructura de nuestros genomas y no necesariamente se asocian a una patología³⁰.

Ventajas del diagnóstico con CMA

Si bien existen diferentes metodologías que permiten realizar un CMA, que se diferencian en la plataforma tecnológica utilizada y en el nivel de resolución alcanzado, la técnica ha permitido reconocer enfermedades genéticas causadas por CNV que no son fácilmente detectadas con los métodos anteriormente descritos, lo que aumenta la capacidad diagnóstica y la descripción de nuevos síndromes (tabla 2)^{31,32}.

Tabla 2. Ejemplos seleccionados de nuevos síndromes de microdelección y microduplicación reconocidos a partir del uso del CMA en el ámbito clínico

Anomalía (número OMIM)	Tamaño mínimo	Fenotipo	Otras características	Relevancia	Fenotipo recíproco
del1q21.1 (612474)	1,35 Mb	DI, microcefalia, dismorfias leves. Otras características incluyen: cataratas, CC y anomalías genitourinarias	Expresividad variable con penetrancia incompleta	0,1-0,4% de las cohortes estudiadas ⁶⁰⁻⁶²	dup1q21.1 se asocia a TEA, EQZ, RDSM, CC y macrocefalia ⁶³
del15q13.3 (612001)	~2 Mb	RDSM, DI, TEA, anomalías EEG, dismorfias leves y EQZ	Expresividad altamente variable con penetrancia incompleta	1-2% de las personas con EIG ^{64,65} ; 0,2-0,4% en DI y/o TEA ^{60,66,67}	dup15q13.3 no tiene un fenotipo reconocible pero puede generar TEA, problemas de aprendizaje y conducta, aunque con penetrancia incompleta ^{67,68}
del16p11.2 (611913)	~0,5 Mb	Macrocefalia, RDSM, retraso del lenguaje expresivo, DI, TEA, obesidad. En menor medida, CC y dismorfias faciales variadas	Expresividad variable con penetrancia casi completa para DI, y menor penetrancia para TEA	Una de las anomalías más comunes detectadas por CMA. ~1% de casos con TEA ^{69,70}	dup16p11.2, que genera: microcefalia, RDSM, retraso motor, DI, TEA, riesgo de EQZ ^{71,72}
dupXq28 (300260)	0,3 Mb	DI importante, hipotonía infantil, espasticidad progresiva, infecciones respiratorias de repetición, epilepsia	Penetrancia completa en hombres. Mujeres portadoras pueden presentar síntomas neuropsiquiátricos y DI variable ⁷³⁻⁷⁵	Duplicación del gen <i>MeCP2</i> . 1-2% en hombres con DI moderada a importante ^{76,77}	Mutaciones (deleciones) de <i>MeCP2</i> , causan el síndrome de Rett

CMA: Cariotipo molecular; CC: cardiopatía congénita; DI: discapacidad intelectual; EIG: epilepsia idiopática generalizada; EQZ: esquizofrenia; MODY: *Madurity-Onset Diabetes of the Young*; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*; RDSM: retraso del desarrollo psicomotor; TEA: trastorno del espectro autista.

En este contexto, las últimas recomendaciones de diferentes sociedades científicas la consideran la técnica de primera línea en el estudio de los trastornos del desarrollo, como anomalías congénitas múltiples no identificadas como un síndrome reconocido, discapacidad intelectual aparentemente no síndrómica y en trastornos del espectro autista³³⁻³⁵.

Adicionalmente, existen microarreglos que incorporan la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNP, por las siglas en inglés), lo que permite identificar grandes regiones de homocigocidad, que pueden indicar que existe consanguinidad o casos de disomía uniparental, con implicancias en casos de posibles enfermedades recesivas.

Limitaciones del diagnóstico con CMA

A pesar de ser una técnica poderosa, el enfoque con CMA solo permite detectar desequilibrios en la información genómica, por lo que aquellas anomalías que involucren un reordenamiento, pero no una pérdida o ganancia neta, pasarán desapercibidas para el método (por ejemplo, inversiones, translocaciones balanceadas). Por otro lado, las herramientas de uso clínico están enfocadas al conocimiento de la información genómica relacionada con problemas médicos, por lo que aquellas variaciones de zonas de heterocromatina de ciertos cromosomas que son visibles al cariotipo no serán detectadas con CMA (por ejemplo, tallos y satélites de cromosomas acrocéntricos que pueden configurar pequeños cromosomas marcadores supernumerarios). Adicionalmente, la mayoría de los algoritmos bioinformáticos tienen limitaciones para detectar poliploidías y bajos niveles de mosaïcismo.

Otro aspecto importante a considerar es que en el análisis por CMA no se visualizan directamente los cromosomas y su estructura, por lo que esta técnica no es capaz, por sí sola, de dar información referente a la ubicación física de los desequilibrios, así como tampoco puede señalar un mecanismo patogénico y riesgo de recurrencia.

Otra limitación está relacionada con la interpretación de los CNV no reportados previamente. Sin embargo, el desarrollo de bases de datos de acceso público con CNV encontrados en individuos controles y en pacientes han ayudado a disminuir progresivamente los casos de incertidumbre³⁶⁻³⁸.

Por estos antecedentes, el cariotipo convencional debe seguir siendo la elección si se sospecha un trastorno como poliploidía o una aneuploidía (trisomías o monosomía), o si existe una historia familiar sugerente de que haya portadores de translocaciones balanceadas (abortos recurrentes, infertilidad, etc.).

De la misma forma, si se sospecha un síndrome de microdelección o de genes contiguos con un test clínico disponible, sigue recomendándose realizar primero el FISH o MLPA específico.

Buscando anomalías en la secuencia del genoma

Diagnóstico convencional: secuenciación de Sanger

Hasta hace unos años, la búsqueda de mutaciones puntuales para el diagnóstico específico de una determinada enfermedad monogénica estaba restringida principalmente al análisis de un *locus* o gen de interés por vez, bajo secuenciación capilar basada en el principio de Sanger³⁹. Sin embargo, debido a que un número importante de enfermedades monogénicas presentan heterogeneidad genética, es posible que el

análisis de un único gen sea insuficiente para detectar todas las posibles causas de una misma enfermedad y se requiera analizar varios genes de forma sucesiva y racionalizada hasta encontrar una etiología. Abordar este problema mediante secuenciación de Sanger incrementa los costos en términos económicos y de tiempo, lo que la hace ineficiente⁴⁰.

Adicionalmente, la capacidad de hacer un diagnóstico etiológico en una condición monogénica estaba muy limitada en casos en que no existieran nuevas hipótesis diagnósticas o en presencia de fenotipos sin etiología reconocida.

Diagnóstico genómico: secuenciación de nueva generación

En los últimos 10 años, e impulsada por la finalización del HGP, surgió una segunda generación de metodologías para permitir una secuenciación a gran escala llamada secuenciación de siguiente o nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés)⁴¹. Existen diferentes plataformas basadas en NGS, que se han ido incorporando al ámbito clínico, aumentando el poder de diagnóstico, principalmente debido a la posibilidad de hacer una gran cantidad de análisis de forma paralela, con menores costos y mayor rendimiento que su predecesora, la secuenciación de Sanger.

Tan solo un par de años después de haber finalizado el HGP, ya estaba en el mercado el primer equipo de NGS⁴². Actualmente, para uso clínico está disponible la secuenciación por NGS de genes individuales, de paneles o conjuntos de genes, así como el conjunto de todas las secuencias de ADN que codifican proteínas (exones), conocido como exoma. Debido a que gran parte de nuestro genoma no codifica para alguna proteína, la secuenciación del exoma completo (WES) abarca aproximadamente el 1-2% del total del genoma humano. Como es sabido que no todas las variantes patogénicas se encuentran en las secuencias codificantes de proteínas, sino que también aparecen en secuencias que tienen una función regulatoria de la expresión génica, se está avanzado cada vez más hacia el uso clínico de la secuenciación del genoma completo (WGS), que ofrece una cobertura de entre un 85 y un 95% del total de la secuencia de un genoma humano¹⁹.

Como se comentó, actualmente existen variadas plataformas de NGS, aunque el equipo MiSeqDx de Illumina es el único sistema de diagnóstico *in vitro* aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE. UU.⁴³. Este equipo es un secuenciador de NGS de sobremesa diseñado específicamente para pruebas de diagnóstico. De hecho, el MiSeqDx se utiliza actualmente para el diagnóstico molecular de la fibrosis quística. Para esto dispone de dos kits; si bien ambos implican secuenciar el gen *CFTR*, difieren en lo que están secuenciando. En el primer kit se secuencian 139 variantes comunes en la población caucásica y en el segundo se secuencian por completo el gen *CFTR*. De esta manera, este ensayo clínico para el gen *CFTR* es el primer sistema de diagnóstico basado en NGS en el mercado aprobado por la FDA⁴⁴.

Ventajas del diagnóstico mediante NGS

Las ventajas del uso de NGS para diagnosticar enfermedades, y especialmente trastornos genéticos, son múltiples⁴⁵. Un test de NGS proporciona la misma o más información que la realización de múltiples test basados en secuenciación por Sanger, pero es más rápido y tiene un precio significati-

vamente más bajo por base secuenciada⁴⁶. Esto se debe a que la tecnología de NGS permite “interrogar” a muchos nucleótidos (por ejemplo, paneles, WES) o todos los nucleótidos del genoma (por ejemplo, WGS) simultáneamente. Además, el uso de los llamados *barcode* o códigos de barra (secuencias específicas de nucleótidos incorporados en los extremos de los fragmentos a secuenciar) permite procesar múltiples muestras de muchos pacientes a la vez⁴¹. Otra de las ventajas es que los genes que se consideraban raramente implicados en una enfermedad y que por lo tanto no se justificaba el costo de desarrollo de un test clínico, pueden ahora ser fácilmente incorporados en paneles de genes para enfermedades específicas sin aumentar considerablemente el costo de la prueba⁴⁶.

Por otra parte, la secuenciación masiva permite interrogar al genoma y obtener múltiples tipos de información útil para un diagnóstico. En este contexto, puede detectar SNP, inserciones/deleciones (*indels*), CNV y translocaciones. Utilizando la misma técnica, pero empleando ARN como material de partida, se puede evaluar transcripción de ARNm y/o micro-ARN, entre otros⁴¹.

Limitaciones del diagnóstico NGS

Por supuesto, como con cualquier tecnología, también hay limitaciones para el diagnóstico de NGS.

Desde el punto de vista técnico, aunque la tecnología se destaca en la identificación de mutaciones raras, es menos eficiente en la búsqueda de *indels* que tienen más de 8-10 pares de bases de longitud¹⁹. Asimismo, no es capaz por sí sola de identificar mutaciones inestables por expansión de nucleótidos, ni alteraciones epigenéticas¹⁹, las cuales deben ser corroboradas por otra técnica independiente. Por otra parte, dependiendo de la cobertura y profundidad del análisis, puede haber bajo nivel de lecturas sobre algunas regiones del genoma, lo que puede significar una pérdida de información putativamente relevante⁴⁰.

También hay desafíos desde el punto de vista bioinformático en el análisis de los resultados producidos por NGS, más específicamente en términos de almacenamiento, manipulación e interpretación de datos³. Los principales inconvenientes de NGS están relacionados con la inmensa cantidad de datos que se generan, lo que provoca verdaderos cuellos de botella en el análisis y la interpretación de un gran número de variantes no reportadas previamente, con el consiguiente impacto en los costos y en el tiempo de respuesta. El desconocimiento de la magnitud de la variación genética normal puede llevar a la confusión en cuanto al verdadero significado de las nuevas variantes, información que puede confundir a los tratantes y los pacientes. Estos inconvenientes pueden resolverse mediante la realización simultánea de este tipo de estudio en los padres del probando y en otros familiares afectados⁴⁷, así como el aumento de la comunicación y el intercambio de datos entre los laboratorios a través de bases de datos públicas, como ClinVar⁴⁸.

Se debe considerar que WES tiene una tasa de detección de un 25% para variantes patogénicas⁴⁹, por lo que debe procurarse una juiciosa selección de los pacientes y racionalmente agotar las instancias previas según cada caso. Al igual que en el caso de CMA, si uno tiene algún gen candidato, es mejor partir haciendo el análisis estándar. Si se trata de un fenotipo con varios genes posibles, sería más útil considerar la realización por NGS de un panel de los genes conocidos. Si

no se encuentra mutación en los genes probables o no hay una orientación clínica del posible gen involucrado, tendría más utilidad considerar un WES o WGS. Por costos, WES puede ser más costo-efectiva que WGS, pero hay que considerar que un resultado negativo no descarta que pueda haber una mutación en una secuencia no codificante.

Es importante indicar que los costos han bajado notablemente desde las primeras experiencias de secuenciación completa del genoma humano, y se espera que sigan disminuyendo. Sin embargo, en el caso de WGS, el costo ronda los 10 000 dólares⁵⁰. Los esfuerzos están enfocados en obtener ensayos que bordeen los 1000 dólares, aunque por el momento es una meta que algunos investigadores creen difícil de conseguir por los cuellos de botellas de la interpretación y el análisis de los datos⁵¹.

Nuevos desarrollos clínicos basados en el diagnóstico genómico

A pesar de las dificultades, los avances en las pruebas genómicas ya están impactando directamente en la vida de las personas. El ejemplo más notable de la potencia de NGS para revolucionar todo un campo de la medicina ha sido la rápida adopción, desde finales de 2011, de la prueba prenatal no invasiva para la detección de aneuploidías fetales en embarazos de alto riesgo².

Otros avances que pueden afectar a la evolución de casos de difícil manejo clínico son las diversas experiencias reportadas por centros de los EE. UU., que ofrecen diagnóstico de NGS en plazos breves¹⁸. Un ejemplo de ello es la prueba genética llamada STAT-Seq, del Centro de Medicina Genómica Pediátrica implementada en la unidad de cuidados intensivos neonatal en el Children's Mercy Clinical Hospital de Kansas City^{52,53}. El principio de STAT-Seq se basa en reducir el tiempo de diagnóstico a alrededor de dos días utilizando WGS con un flujo de análisis (*pipeline*) bioinformático automatizado. Habitualmente, las familias de los recién nacidos con enfermedades genéticas esperan semanas, meses o incluso años para tener la oportunidad de recibir un diagnóstico. Dada la existencia de más de 4000 enfermedades genéticas diferentes, muchas familias se quedan sin diagnóstico etiológico, incluso con la realización de diferentes test específicos. En otros casos, hay familias que reciben un diagnóstico post mortem². Con STAT-seq y otras experiencias similares, se pueden tomar decisiones informadas sobre las mejores alternativas de manejo y seguimiento disponibles con el conocimiento actual, e incluso existe la posibilidad de identificar una enfermedad potencialmente tratable^{18,52,53}.

Estos son solo algunos ejemplos, ya que diversos centros y compañías han desarrollado test con paneles de genes (es decir, se selecciona un grupo de genes que se sabe están relacionados de alguna manera con la enfermedad) en patologías tan diversas como: cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades cardíacas, enfermedades infecciosas y dermatológicas, entre otras⁵⁴⁻⁵⁸. Hablar de cada una de ellas se escapa del interés de este artículo; sin embargo, resulta interesante ver cómo cada día se van sumando nuevas patologías al diagnóstico de NGS.

Si bien el diagnóstico molecular basado en NGS está empezando a tomar fuerza, aún queda mucho por hacer e im-

plementar, tanto a nivel de estrategias de secuenciación como a nivel de interpretación y análisis de los resultados, tanto a nivel de cómo filtrar e identificar las variantes (análisis bioinformático) así como en la interpretación clínica. En este contexto, se han desarrollado diversos algoritmos informáticos que permiten detectar grandes variaciones estructurales con los datos de NGS. Dependiendo del perfeccionamiento de estas herramientas se podría lograr a medio plazo que un único ensayo tenga la capacidad de detectar de forma simultánea rearrreglos genómicos de gran escala y cambios puntuales²⁹.

Pese a las dificultades, en los años venideros contaremos con una creciente cantidad de test que utilizarán este tipo de tecnología.

Conclusiones

Es innegable que cada vez se ha avanzado más en el reconocimiento de las bases moleculares de las enfermedades humanas. Actualmente, estos avances están disponibles para el uso clínico, y entre ellos destaca la existencia de análisis moleculares que permiten la confirmación de las mutaciones.

Un punto no menos importante es el costo de estas herramientas diagnósticas. En varios países, el CMA está incorporado en las coberturas de los sistemas de salud y puede tener un costo similar al de un cariotipo convencional. En el caso de NGS, su costo ha bajado notablemente desde la finalización del HGP, aunque aún sigue siendo prohibitivo para gran parte de la población. En nuestro país, solo un puñado de estudios genéticos tiene algún tipo de cobertura dentro del sistema de salud, por lo que existe el desafío de que haya una actualización en la lista de estudios y que vaya a la par con los nuevos avances y las crecientes necesidades.

Debido a que es esperada una variabilidad genética individual, existen muchos desafíos relacionados con la interpretación de los hallazgos. En el caso del CMA hay cada vez más experiencia acumulada, con disponibilidad de bases de datos de variaciones normales y patogénicas, lo que ayuda a que cada vez existan menos casos de incierta interpretación. En el caso de la NGS, junto con bases de datos específicas, muchas veces es necesario hacer ensayos complementarios (funcionales o modelamientos informáticos) para disponer de información clara sobre la posible patogenicidad de una variante.

Por lo anterior, es importante reafirmar que, como para cualquier test genético, los pacientes y sus familias deben tener un asesoramiento antes y después del test donde se pueda conversar sobre los posibles escenarios que puede generar esta información, lo que se conoce como asesoramiento genético. El conocimiento derivado de identificar la etiología permite acortar la “odisea diagnóstica”, asesorar adecuadamente a los pacientes y sus familias en la toma de decisiones, así como optimizar los escasos recursos existentes, centrándose en los problemas conocidos y previsibles según cada patología. En algunos casos, el conocimiento del tipo de mutación puede tener implicancias no solo en el diagnóstico, sino también en el manejo, seguimiento y en potenciales perspectivas terapéuticas⁵⁹.

Glosario de términos de genética utilizado en el escrito

Cariotipo molecular (CMA) o *microarrays* cromosómicos. Técnica basada en microchips que permite detectar pérdidas o ganancias de información genómica de una muestra (linfocitos, tumor, etc.) de un individuo en comparación con un control o referencia.

Copy-number variants* (CNV).** Es un tipo de variación genética submicroscópica que implica pérdida o ganancia de información a partir de 1 kb. Si un CNV se encuentra sobre el 1% de la población, es considerado polimórfico (copy-number polymorphism***, CNP).

Exoma. Conjunto total de exones. Por tanto, es el conjunto de información genética que codifica para proteínas, lo que corresponde a aproximadamente el 1% del genoma nuclear humano.

Genoma. La totalidad de la información genética contenida en una célula de un organismo determinado. En la especie humana debemos considerar el genoma nuclear (conjunto de los cromosomas) y el genoma extranuclear (ADN mitocondrial).

Indel. Inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Cualquier ***indel*** con un tamaño sobre 1 kb se debe considerar CNV.

Secuenciación de Sanger. Método ideado por F. Sanger para obtener la secuencia ordenada de nucleótidos de fragmentos relativamente pequeños de ADN (~500 pb). Sigue siendo el método de referencia (***gold standard***) para corroborar la existencia de mutaciones puntuales detectadas por NGS.

***Next-generation sequencing* (NGS).** Diversas metodologías que permiten obtener secuencias genómicas a gran escala (desde *locus*/genes individuales hasta genomas completos), en un menor plazo y con menor costo total que si se realizara con la secuenciación de Sanger.

Heterogeneidad genética (de *locus*). Fenómeno en que un mismo fenotipo puede ser la consecuencia de anomalías en *locus* (genes) diferentes. Es decir, en un individuo o familia, la enfermedad “A” es causada por el gen “Z”, mientras que en otra familia la misma enfermedad “A” es causada por el gen “W”. Muchas enfermedades genéticas presentan este fenómeno, incluso hay enfermedades que pueden ser generadas por mutaciones en más de 10 genes distintos y con patrones de herencia diferentes.

Single nucleotide polymorphism* (SNP).** *Locus* de un único nucleótido, donde es habitual que existan dos alelos posibles (ejemplo: o nucleótido A o bien nucleótido G). Si el alelo (nucleótido) menos común se encuentra sobre el 1% de una población se considera SNP, mientras que si el alelo minoritario se encuentra en menos del 1%, este alelo es una variante rara (single nucleotide variant***, SNV). Se conocen varios millones de SNP a lo largo de todo el genoma humano, por lo que buena parte de la variabilidad normal entre individuos viene dada por este tipo de polimorfismo.

Whole exome sequencing (WES). Metodología que permite estudiar la secuencia completa del exoma.

Whole genome sequencing (WGS). Metodología que permite estudiar la secuencia completa del genoma. Incluye al exoma, así como a las secuencias intrónicas e intergénicas.

Conflicto de interés

Este trabajo cumple con los requisitos sobre consentimiento/asentimiento informado, comité de ética, financiamiento, estudios animales y sobre la ausencia de conflictos de intereses según corresponda.

Referencias

- GeneTestsTM [Internet]. [acceso 22-08-2014]. Disponible en: <http://www.genetests.org/>
- Nepomnyashchaya YN, Artemov AV, Roumiantsev SA, Roumyantsev AG, Zhavoronkov A: Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 1141-54.
- Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L: Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013; 340: 284-95.
- Rubio C: Next-generation sequencing: challenges in reproductive genetics. *Fertil Steril* 2014; 101: 1252-3.
- Major E, Rigó K, Hague T, Bércecs A, Juhos S: HLA typing from 1000 genomes whole genome and whole exome illumina data. *Plos One* 2013; 8: e78410.
- Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraal M, Boes ML, van de Corput L, Renner ED, van Zon P, van Lieshout S, Elferink MG, van der Burg M, Vermont CL, van der Zwaag B, Janson E, Cuppen E, Ploos van Amstel JK, van Gijn ME. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 529-34.
- Padmanabhan R, Mishra AK, Raouf D, Fournier P-E: Genomics and metagenomics in medical microbiology. *J Microbiol Methods* 2013; 95: 415-24.
- Green ED, Guyer MS, National Human Genome Research Institute: Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* 2011; 470: 204-13.
- Wordsworth S, Buchanan J, Regan R, Davison V, Smith K, Dyer S, Campbell C, Blair E, Maher E, Taylor J, Knight SJ: Diagnosing idiopathic learning disability: a cost-effectiveness analysis of microarray technology in the National Health Service of the United Kingdom. *Genomic Med* 2007; 1: 35-45.
- Regier DA, Friedman JM, Marra CA: Value for money? Array genomic hybridization for diagnostic testing for genetic causes of intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 765-72.
- Trakadis Y, Shevell M: Microarray as a first genetic test in global developmental delay: a cost-effectiveness analysis. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53: 994-9.
- Hall JG, Powers EK, McIlvaine RT, Ean VH: The frequency and financial burden of genetic disease in a pediatric hospital. *Am J Med Genet* 1978; 1: 417-36.
- McCandless SE, Brunger JW, Cassidy SB: The Burden of Genetic Disease on Inpatient Care in a Children's Hospital. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 121-7.
- Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K: Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 301-5.
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ: Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 2010; 42: 30-5.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloğlu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP: Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 19096-101.
- Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, Helbling D, Bonacci BB, Decker B, Serpe JM, Dasu T, Tschannen MR, Veith RL, Basehore MJ, Broeckel U, Tomita-Mitchell A, Arca MJ, Casper JT, Margolis DA, Bick DP, Hessner MJ, Routes JM, Verbsky JW, Jacob HJ, Dimmock DP: Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 2011; 13: 255-62.
- Jacob HJ, Abrams K, Bick DP, Brodie K, Dimmock DP, Farrell M, Geurts J, Harris J, Helbling D, Joers BJ, Kliegman R, Kowalski G, Lazar J, Margolis DA, North P, Northup J, Roquemore-Goins A, Scharer G, Shimoyama M, Strong K, Taylor B, Tsaih SW, Tschannen MR, Veith RL, Wendt-Andrae J, Wilk B, Worthey EA: Genomics in Clinical Practice: Lessons from the Front Lines. *Sci Transl Med* 2013; 5: 194cm5.
- Biesecker LG, Green RC: Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* 2014; 370: 2418-25.
- Trask BJ: Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 769-78.
- Smeets DFCM: Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem* 2004; 37: 439-46.
- Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H: Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet* 2004; 66: 265-75.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-21.
- Cheung SW, Shaw CA, Yu W, Li J, Ou Z, Patel A, Yatsenko SA, Cooper ML, Furman P, Stankiewicz P, Lupski JR, Chinault AC, Beaudet AL: Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med* 2005; 7: 422-32.
- Edelmann L, Hirschhorn K: Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1151: 157-66.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007; 39(7 Suppl): S48-54.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW: Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 85-97.
- Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z: Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics* 2013; 14 (Suppl 11): S1.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwork C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME: Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-54.
- Schluth-Bolard C, Till M, Ederly P, Sanlaville D: Syndromes chromosomiques émergents. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56: 380-7.

32. Slavotinek AM: Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* 2008; 124: 1-17.
33. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O: Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet* 2007; 15: 1105-14.
34. Manning M, Hudgins L: Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010; 12: 742-5.
35. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH: Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 749-64.
36. International Collaboration for Clinical Genomics (ICCG): International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium Database Search [Internet]. [acceso 09-09-2014]. Disponible en: <http://www.iccg.org/>
37. Database of Genomic Variants (DGV) [Internet] [acceso 09-09-2014]. Disponible en: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
38. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER) [Internet] [acceso 09-09-2014]. Disponible en: <https://decipher.sanger.ac.uk/>
39. Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94: 441-8.
40. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, Mensenkamp AR, Rodenburg RJ, Yntema HG, Spruijt L, Vermeer S, Rinne T, van Gassen KL, Bodmer D, Lugtenberg D, de Reuver R, Buijsman W, Derks RC, Wieskamp N, van den Heuvel B, Ligtenberg MJ, Kremer H, Koolen DA, van de Warrenburg BP, Cremers FP, Marcelis CL, Smeitink JA, Wortmann SB, van Zelst-Stams WA, Veltman JA, Brunner HG, Scheffer H, Nelen MR: A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat* 2013; 34: 1721-6.
41. Metzker ML: Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31-46.
42. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM: Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-80.
43. Collins FS, Hamburg MA: First FDA Authorization for Next-Generation Sequencer. *N Engl J Med* 2013; 369: 2369-71.
44. Illumina, Inc. The MiSeqDx Instrument [Internet] [acceso 16-08-2014]. Disponible en: <http://www.illumina.com/clinical/diagnostics/ivd-assay-development/miseqdx-instrument.ilmn>
45. Iglesias A, Anyane-Yeboah K, Wynn J, Wilson A, Truitt Cho M, Guzman E, Sisson R, Egan C, Chung WK: Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-80.
46. Thompson R, Drew CJG, Thomas RH: Next generation sequencing in the clinical domain: clinical advantages, practical, and ethical challenges. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2012; 89: 27-63.
47. Korf BR, Rehm HL: New approaches to molecular diagnosis. *JAMA* 2013; 309: 1511-21.
48. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR: ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D980-5.
49. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM: Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *N Engl J Med* 2013; 369: 1502-11.
50. Kucherlapati R: Genomics and Proteomics. En: Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B, editores. *Emerging and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Academic Press; 2013. p. 1-10.
51. Perkel J: Finding the true \$1000 genome. *BioTechniques* 2013; 54: 71-4.
52. The Children's Mercy Hospital. Pediatric Genomic Medicine, STAT-Seq [Internet] [acceso 16-08-2014]. Disponible en: http://www.childrensmc.org/Health_Care_Professionals/Research/Pediatric_Genomic_Medicine/STAT-Seq/
53. Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, Dinwiddie DL, Noll A, Alnadi NA, Andraws N, Patterson ML, Krivohlavek LA, Fellis J, Humphray S, Saffrey P, Kingsbury Z, Weir JC, Betley J, Grocock RJ, Margulies EH, Farrow EG, Artman M, Safina NP, Petrikin JE, Hall KP, Kingsmore SF: Rapid Whole-Genome Sequencing for Genetic Disease Diagnosis in Neonatal Intensive Care Units. *Sci Transl Med* 2012; 4: 154ra135.
54. Foo JN, Liu J, Tan E-K: Next-generation sequencing diagnostics for neurological diseases/disorders: from a clinical perspective. *Hum Genet* 2013; 132: 721-34.
55. Chang F, Li MM: Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. *Cancer Genet* 2013; 206: 413-9.
56. Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G: Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *J Clin Virol* 2013; 58: 346-50.
57. Li X, Buckton AJ, Wilkinson SL, John S, Walsh R, Novotny T, Valaskova I, Gupta M, Game L, Barton PJ, Cook SA, Ware JS: Towards clinical molecular diagnosis of inherited cardiac conditions: a comparison of bench-top genome DNA sequencers. *PLoS One* 2013; 8: e67744.
58. Takeichi T, Liu L, Fong K, Ozoemena L, McMillan JR, Salam A, Campbell P, Akiyama M, Mellerio JE, McLean WH, Simpson MA, McGrath JA: Whole-exome sequencing improves mutation detection in a diagnostic epidermolysis bullosa laboratory. *Br J Dermatol* 2014. Jun 19. doi: 10.1111/bjd.13190. [Epub ahead of print].
59. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group: A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011; 365: 1663-72.
60. Kirov G, Rees E, Walters JT, Escott-Price V, Georgieva L, Richards AL, Chambert KD, Davies G, Legge SE, Moran JL, McCarrroll SA, O'Donovan MC, Owen MJ: The Penetrance of Copy Number Variations for Schizophrenia and Developmental Delay. *Biol Psychiatry* 2014; 75: 378-85.
61. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI, Mefford H, Ying P, Nickerson DA, Eichler EE: Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 148-61.
62. Sahoo T, Theisen A, Rosenfeld JA, Lamb AN, Ravnan JB, Schultz RA, Torchia BS, Neill N, Casci I, Bejjani BA, Shaffer LG: Copy number variants of schizophrenia susceptibility loci are associated with a spectrum of speech and developmental delays and behavior problems. *Genet Med* 2011; 13: 868-80.

63. Dolcetti A, Silversides CK, Marshall CR, Lionel AC, Stavropoulos DJ, Scherer SW, Bassett AS: 1q21.1 Microduplication expression in adults. *Genet Med* 2013; 15: 282-9.
64. Dibbens LM, Mullen S, Helbig I, Mefford HC, Bayly MA, Bellows S, Leu C, Trucks H, Obermeier T, Wittig M, Franke A, Caglayan H, Yapici Z; EPICURE Consortium, Sander T, Eichler EE, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF: Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3626-31.
65. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, de Kovel C, Baker C, von Spiczak S, Kron KL, Steinich I, Kleefuss-Lie AA, Leu C, Gaus V, Schmitz B, Klein KM, Reif PS, Rosenow F, Weber Y, Lerche H, Zimprich F, Urak L, Fuchs K, Feucht M, Genton P, Thomas P, Visscher F, de Haan GJ, Møller RS, Hjalgrim H, Luciano D, Wittig M, Nothnagel M, Elger CE, Nürnberg P, Romano C, Malafosse A, Koeleman BP, Lindhout D, Stephani U, Schreiber S, Eichler EE, Sander T: 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* 2009; 41: 160-2.
66. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE: A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 2008; 40: 322-8.
67. Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, Cox GF, Dickinson H, Gentile J, Harris DJ, Hegde V, Hundley R, Khwaja O, Kothare S, Luedke C, Nasir R, Poduri A, Prasad K, Raffalli P, Reinhard A, Smith SE, Sobeih MM, Soul JS, Stoler J, Takeoka M, Tan WH, Thakuria J, Wolff R, Yusupov R, Gusella JF, Daly MJ, Wu BL: Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet* 2009; 46: 242-8.
68. Van Bon BW, Mefford HC, Menten B, Koolen DA, Sharp AJ, Nillesen WM, Innis JW, de Ravel TJ, Mercer CL, Fichera M, Stewart H, Connell LE, Ounap K, Lachlan K, Castle B, Van der Aa N, van Ravenswaaij C, Nobrega MA, Serra-Juhé C, Simonic I, de Leeuw N, Pfundt R, Bongers EM, Baker C, Finnemore P, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, van Kalmthout M, Elia M, Vandeweyer G, Fryns JP, Janssens S, Foulds N, Reitano S, Smith K, Parkel S, Loeyls B, Woods CG, Oostra A, Speleman F, Pereira AC, Kurg A, Willatt L, Knight SJ, Vermeesch JR, Romano C, Barber JC, Mortier G, Pérez-Jurado LA, Kooy F, Brunner HG, Eichler EE, Kleefstra T, de Vries BB: Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *J Med Genet* 2009; 46: 511-23.
69. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ; Autism Consortium: Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. *N Engl J Med* 2008; 358: 667-75.
70. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapuram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Falciano C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW: Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 477-88.
71. Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A, Clark G, Lee J, Proud M, Stocco A, Rodriguez DL, Koziel BA, Sparagana S, Roeder ER, McGrew SG, Kurczynski TW, Allison LJ, Amato S, Savage S, Patel A, Stankiewicz P, Beaudet AL, Cheung SW, Lupski JR: Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 2010; 47: 332-41.
72. McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, Perkins DO, Dickel DE, Kusenda M, Krastoshevsky O, Krause V, Kumar RA, Grozeva D, Malhotra D, Walsh T, Zackai EH, Kaplan P, Ganesh J, Krantz ID, Spinner NB, Rocanova P, Bhandari A, Pavon K, Lakshmi B, Leotta A, Kendall J, Lee YH, Vacic V, Gary S, Iakoucheva LM, Crow TJ, Christian SL, Lieberman JA, Stroup TS, Lehtimäki T, Puura K, Haldeman-Englert C, Pearl J, Goodell M, Willour VL, Derosse P, Steele J, Kassem L, Wolff J, Chitkara N, McMahon FJ, Malhotra AK, Potash JB, Schulze TG, Nöthen MM, Cichon S, Rietschel M, Leibenluft E, Kustanovich V, Lajonchere CM, Sutcliffe JS, Skuse D, Gill M, Gallagher L, Mendell NR; Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC, Shaikh TH, Susser E, Delisi LE, Sullivan PF, Deutsch CK, Rapoport J, Levy DL, King MC, Sebat J: Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 2009; 41: 1223-7.
73. Ramocki MB, Peters SU, Tavyev YJ, Zhang F, Carvalho CM, Schaf CP, Richman R, Fang P, Glaze DG, Lupski JR, Zoghbi HY: Autism and other Neuropsychiatric Symptoms are Prevalent in Individuals with MECP2 Duplication Syndrome. *Ann Neurol* 2009; 66: 771-82.
74. Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T: MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev* 2013; 35: 411-9.
75. Bijlsma EK, Collins A, Papa FT, Tejada MI, Wheeler P, Peeters EA, Gijssbers AC, van de Kamp JM, Kriek M, Losekoot M, Broekma AJ, Crolla JA, Pollazzon M, Mucciolo M, Katzaki E, Disciglio V, Ferreri MI, Marozza A, Mencarelli MA, Castagnini C, Dosa L, Ariani F, Mari F, Canitano R, Hayek G, Botella MP, Gener B, Minguez M, Renieri A, Ruivenkamp CA: Xq28 duplications including MECP2 in five females: Expanding the phenotype to severe mental retardation. *Eur J Med*
76. Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journal H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Geetz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP: Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 444-53.
77. Del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB: Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med* 2006; 8: 784-92.