



Pediatría

<http://www.revistapediatria.org/>
DOI: <https://doi.org/10.14295/rp.v56i2.230>



Revisión narrativa

Rendimiento del exoma para el diagnóstico temprano de las enfermedades raras genéticas en pacientes pediátricos. Revisión Narrativa

Exome yield for early diagnosis of rare genetic diseases in pediatric patients. Narrative Review

Martha Cecilia Piñeros-Fernández

Servicio de Neuropediatría Hospital Pediátrico Fundación Cardioinfantil – La Cardio y Unidad de Pediatría Los Cobos Medical Center. Bogotá, Colombia.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido: 21 de septiembre de 2020

Aceptado: 20 de junio de 2023

Editor adjunto

Alvaro León Jácome Orozco

Palabras clave:

Niños

Enfermedades raras

Enfermedades huérfanas

Exoma

Secuenciación de exoma completo

Rendimiento diagnóstico

R E S U M E N

Introducción: La definición establecida por la Organización Mundial de la Salud de las enfermedades raras es: «aquellas que afectan a menos de 5 a 7 individuos en 10.000 y, aproximadamente del 6 % al 8 % de la población mundial» **Temática:** la categoría fenotípica más común de los casos pediátricos y de adultos son los trastornos neurológicos en estudios realizados en diferentes países. En enfermedades raras como son los trastornos de las plaquetas e inmunodeficiencias el rendimiento diagnóstico del exoma se aproxima al 25 % reportado para enfermedades genéticas de presentación común. Los datos de rendimiento diagnóstico del exoma se encuentran por encima del 50 % en enfermedades neurológicas pediátricas tales como enfermedades neuromusculares, trastornos neurometabólicos y paraplejía espástica hereditaria y del 50 % en miocardiopatías dilatadas hereditarias. **Conclusión:** los avances tecnológicos como la secuenciación de nueva generación han facilitado significativamente el diagnóstico y el descubrimiento de genes nuevos en pacientes con enfermedades genéticas raras, especialmente con la introducción de la secuenciación del exoma.

A B S T R A C T

Introduction: The definition established by the World Health Organization of rare diseases is: «those that affect less than 5 to 7 individuals in 10,000 and approximately 6 % to 8 % of

*Autor para correspondencia. Martha Cecilia Piñeros-Fernández
Correo electrónico: martha.pineros.md@gmail.com

Keywords:

Child
Rare disease
Orphan disease
Exome
Whole exome sequencing
Diagnostic yield

the world population» **Theme:** The most common phenotypic category of pediatric and adult cases are neurological disorders in studies conducted in different countries. In rare diseases such as platelet disorders and immunodeficiencies, the diagnostic yield of the exome is close to the 25 % reported for genetic diseases of common presentation. Exome diagnostic yield data is above 50 % in pediatric neurological diseases such as neuromuscular diseases, neurometabolic disorders, and hereditary spastic paraplegia and 50 % in hereditary dilated cardiomyopathies. **Conclusion:** Technological advances such as next-generation sequencing has significantly facilitated the diagnosis and discovery of novel genes in patients with rare genetic diseases, especially with the introduction of exome sequencing.

Introducción

La definición establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las enfermedades raras (ER) es: «aquellas que afectan a menos de 5 a 7 individuos en 10,000 y, aproximadamente del 6 % al 8 % de la población mundial» (1). Las estimaciones varían respecto de exactamente cuántas ER existen, en parte porque cada país define de manera diferente estas enfermedades. El número total de ER oscila entre 5 000 a 8 000 enfermedades (2,3).

Las ER afectan a un número reducido de personas de la población general por esta razón plantean ciertas particularidades (4), como por ejemplo las dificultades para su diagnóstico. Menos del 5 % de las más de 7 000 ER que se cree afectan a los humanos actualmente tienen un tratamiento efectivo (5).

La categorización como tal de las ER empezó a ser aplicada a partir de la Ley de medicamentos huérfanos (*Orphan Drug Act*, ODA) promulgada por primera vez en los Estados Unidos en 1983, creada para fomentar el desarrollo de medicamentos para ER (6). De acuerdo con la legislación europea, las ER tienen «un límite de prevalencia de no más de 5 casos por cada 10.000» (Reglamento (CE) N.º 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 16 de diciembre de 1999, sobre medicamentos huérfanos) (7). En Estados Unidos se define una ER cuando la enfermedad afecta a menos de 200 000 personas (2).

Según las estimaciones de la organización privada internacional de pacientes y familias *Genes Global Project*, 350 millones de personas en el mundo presentan alguna ER, 8 de cada 10 enfermedades raras son de causa genética y el 50 % de los afectados por una ER son niños (8).

La incidencia de las ER en el mundo considerada individualmente es variable, de acuerdo con la OMS «va desde una incidencia de aproximadamente 1 caso por 15.000 habitantes de la fibrosis quística y la hemofilia, hasta enfermedades extremadamente raras de un caso por millón de habitantes como ocurre con la trigonocefalia de Opitz» (9).

En Colombia la ley 1392 de 2010 por medio de la cual se han reconocido las enfermedades huérfanas las que afectan menos 1 por cada 5 000 personas (10). El 10.74 % de personas con enfermedades huérfanas en Colombia tiene discapacidad según el censo realizado en el 2013 (11).

Las tasas mortalidad por ER en Colombia son mayores la población masculina de todas las edades principalmente por leucemia linfoblástica aguda, distrofia muscular, displasia broncopulmonar originada en el periodo perinatal, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré y gastrosquisis. En las mujeres, la esclerosis múltiple fue la primera causa de muerte, seguida de leucemia linfocítica aguda, gastrosquisis, displasia

broncopulmonar originada en el periodo perinatal, síndrome de Guillain-Barré y leucemia mieloide aguda (12).

Etiología y clasificación de las enfermedades raras

Se estima que el 80 % de las ER tienen origen genético, ya sea monogénico o poligénico, las ER de origen no genético son entre otras las enfermedades infecciosas raras, cánceres raros o enfermedades autoinmunes raras (3) (Tabla 1).

En la base de datos de enfermedades de herencia mendeliana (*Online Mendelian Inheritance in man*, OMIM) de los Institutos de Salud de Estados Unidos (*National Institutes of Health*, NIH) se encuentran descritos actualmente 5 544 fenotipos para los cuales se conoce una base molecular y 3 314 fenotipos sin una base molecular conocida (13) de estos últimos dos tercios corresponden a ER (14).

Para permitir la visibilización de las ER y calcular con precisión los datos de morbilidad y mortalidad, el grupo asesor temático sobre ER de la OMS y Orphanet en el año 2010 gestionaron el proceso de revisión de la clasificación de las ER las cuales no siempre tienen un código específico, para hacer los registros correctos con los códigos de la clasificación internacional de enfermedades (CIE) en la versión 10 vigente en esa fecha (15).

Diagnóstico de las enfermedades raras

Se estima que el tiempo promedio para lograr al diagnóstico de una enfermedad rara (ER) es de 8 años (8). Se ha denominado «odisea diagnóstica» a la búsqueda del conocimiento e información sobre un diagnóstico en no pocos casos el proceso inicia para las familias de afectados desde el período neonatal (16).

Diagnóstico genético de las enfermedades raras

El concepto de secuenciación, atribuido a Sanger o de primera generación se basa en la demostración hecha por Sanger por primera vez sobre la composición de las proteínas caracterizada por polipéptidos lineales formados por la unión de residuos de aminoácidos en un orden definido, pero aparentemente arbitrario (17). El concepto se trasladó a la secuenciación del DNA.

Los métodos más nuevos se denominan de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing* – [NGS]) (18). Antes del desarrollo de la secuenciación masiva en paralelo o de nueva generación, se requería hacer la secuenciación individual de cada gen y, si resultaba normal, se seguía estudiando

en forma sucesiva otros genes candidatos también mediante secuenciación, con elevados costos en dinero y tiempo (19).

Paneles multigénicos

Son útiles para el estudio de una enfermedad o fenotipo hereditario genéticamente heterogéneo. La heterogeneidad genética consiste en que variantes patógenas en diferentes genes pueden causar un mismo fenotipo o una misma enfermedad genética. Los avances en las técnicas de secuenciación masiva en paralelo o de nueva generación han llevado al desarrollo y uso generalizado de paneles multigénicos, que permiten la prueba simultánea desde dos hasta más de 150 genes. Los métodos utilizados en los paneles multigénicos pueden incluir análisis de secuenciación, análisis de supresión - duplicación y/u otras pruebas no basadas en secuenciación (20).

Exoma

El exoma es la parte del genoma (conjunto de moléculas de DNA) formado por los exones, los fragmentos de DNA que se transcriben para dar lugar a las proteínas. El estudio del exoma es una de las formas más completas y complejas de estudiar el DNA. La secuenciación del exoma es una técnica para secuenciar (conocer la secuencia de las bases de DNA, es decir, cómo se ordenan en la cadena de DNA de todos los genes codificadores, esto corresponde al 1 % del genoma completo,

siendo una estrategia eficiente para identificación de mutaciones funcionales raras (21).

Consiste en seleccionar primero ese subconjunto de DNA que codifica las proteínas, es decir, los exones. En un paso posterior se trata de identificar la secuencia usando una tecnología de secuenciación de DNA de alto rendimiento o secuenciación masiva.

El rendimiento diagnóstico se refiere a la proporción de individuos con un fenotipo determinado en quienes se detecta una variante patogénica o mutación en la secuenciación de un gen, exoma o genoma (22).

La secuenciación del exoma del probando tiene un rendimiento diagnóstico estimado del 25 %. Los casos para los cuales la secuenciación del exoma no es diagnóstica se debe a que el diagnóstico se encuentra fuera de los datos producidos, la mutación causante se encuentra en una región de codificación no cubierta por el exoma, o es no codificante; o la causa no es genética (23). Cada año se reportan aproximadamente 250 asociaciones nuevas de genes y enfermedades y 9 200 asociaciones de variante y enfermedades (24).

Análisis reiterado del exoma ("Repeated exome analysis")

La disponibilidad de datos de frecuencia de variantes entre poblaciones grandes ha llevado a que muchas variantes de significado incierto se reclasifiquen como benignas, y la realización de pruebas a miembros de la familia del probando pueden llevar a la reclasificación de variantes (25).

Tabla 1 . Clasificación de las enfermedades raras

Clasificación de las enfermedades raras según órgano, sistema o tipo de compromiso

Enfermedades cardíacas raras
 Anomalías del desarrollo durante la embriogénesis
 Malformaciones cardíacas raras
 Trastornos raros de la succión -deglución
 Errores innatos del metabolismo raros
 Enfermedades gastrointestinales
 Enfermedades genéticas
 Enfermedades neurológicas
 Enfermedades abdominales quirúrgicas
 Enfermedades hepáticas
 Enfermedades respiratorias
 Enfermedades urogenitales
 Enfermedades torácicas quirúrgicas
 Enfermedades de la piel
 Enfermedades renales
 Enfermedades de los ojos
 Enfermedades endocrinológicas
 Enfermedades hematológicas
 Enfermedades inmunológicas
 Enfermedades reumatológicas
 Enfermedades odontológicas
 Enfermedades del sistema circulatorio
 Trastornos raros de la fertilidad
 Enfermedades neoplásicas
 Intoxicaciones raras
 Enfermedades gineco-obstétricas
 Enfermedad maxilofacialesquirúrgicas
 Enfermedades alérgicas
 Enfermedades teratológicas
 Anomalías cromosómicas
 Enfermedades reumatológicas de la infancia
 Enfermedades raras con potencial indicación de trasplante

Genoma

El genoma humano incluye todas las secuencias de ADN mitocondrial y nuclear codificante y no codificante. El ADN nuclear codifica la mayoría de los más de 20,000 genes en humanos y el ADN mitocondrial codifica 37 genes. Más de 3,2 millones de pares de bases que forman el genoma humano son en su mayoría secuencias de ADN repetitivo o no codificante (20). Con la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés), el genoma humano completo de 6 mil millones de pares de bases se lee en una única prueba que permite la detección de variaciones genéticas con una resolución de pares de bases en un individuo (26). Otros estudios genéticos como la secuenciación de ARN (RNAseq) permite determinar la estructura transcripcional de los genes (27). Puede ser útil para detección de mutaciones asociadas a enfermedades raras que cursan trastornos neuromusculares no detectadas con paneles de genes y la secuenciación del exoma (28).

Objetivo

El objetivo de la presente revisión revisar la información actualizada sobre el rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma para ER en edad pediátrica, empleado para el diagnóstico de las enfermedades raras.

Desarrollo del tema

Para la presente revisión narrativa se consultaron las bases de datos Medline, Lilacs BVS y Google Scholar. Se revisaron estudios en español, inglés. Los términos utilizado para las búsquedas fueron [child, rare diseases, orphan diseases, whole exome sequencing, exome, diagnostic yield] y los operadores booleanos AND y OR.

En la tabla 2 se resumen las características y resultados de 17 estudios sobre diagnóstico de ER mediante exoma, las patologías sobre las que versaron los estudios fueron principalmente neurológicas.

Factores relacionados con el rendimiento diagnóstico del exoma en ER

La variabilidad clínica de ciertas patologías podría influir en el rendimiento diagnóstico, un ejemplo de esto es estudio sobre diagnóstico de inmunodeficiencias con un elevado número de participantes sin embargo el rendimiento diagnóstico no fue superior al observado al reportado en general para estudios exoma (29), dentro del grupo de inmunodeficiencias que hace difícil establecer fenotipos exhaustivos como si se logra con enfermedades como las neuromusculares (30).

En trastornos hereditarios de las plaquetas el rendimiento del exoma puede ser incluso de 23 % que es un dato inferior al 25 % esperado en enfermedades mendelianas comunes (31). En condiciones genéticamente heterogéneas el rendimiento diagnóstico del exoma se incrementa hasta 86 % en comparación con el 39 % cuando se trata de un diagnóstico no conocido, es menor del 25 % en casos de discapacidad intelectual sin anomalías congénitas (14 %), el exoma en trío es decir cuando se realiza la secuenciación de exoma del paciente afectado y

de sus dos progenitores tendría un mayor rendimiento en este subgrupo de pacientes (32).

Rendimiento del exoma en enfermedades raras neurológicas en pacientes pediátricos

En el estudio del Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH) de pacientes con ER no diagnosticadas la categoría fenotípica más común de los casos pediátricos y de adultos fueron los trastornos neurológicos, que abarcaron el 43 % de los solicitantes y el 53 % de los pacientes aceptados (33).

Los resultados del grupo del Programa Español de pacientes con ER no diagnosticadas (34) sobre el análisis del exoma de pacientes con patologías diversas, también mostraron una elevada frecuencia de pacientes con cuadros clínicos neuro genéticos que son trastornos son muy complejos y los pacientes suelen tener fenotipos amplios y diversos, como discapacidad intelectual, micro o macrocefalia, retraso del desarrollo neurológico, problemas de alimentación, epilepsia, hipotonía, anomalías de la estructura del cerebro, rasgos faciales dismórficos, etc. En este mismo estudio citan los resultados de la publicación de Yang sobre el análisis diagnóstico de 2000 pacientes con sospecha de trastornos genéticos, los pacientes eran principalmente pediátricos (88 %) con diversas manifestaciones clínicas, la mayoría de las cuales incluían disfunción del sistema nervioso (23). Otro grupo de enfermedades en los que la utilidad del exoma es superior al 70 % es el de las ictiosis hereditarias (35).

En el registro de pacientes con enfermedades raras realizado en Veneto (Italia) se encontró que el porcentaje de pacientes con enfermedades del sistema nervioso en el grupo de edad pediátrica era casi el doble que en el de adultos (13 % vs. 5.8 %) (36).

En las ER con fenotipo neurológico, los resultados de rendimiento diagnóstico se ubican por encima del 50 % para enfermedades neuromusculares (30,37), trastornos neuro metabólicos (38) y paraplejía espástica hereditaria (39) y miocardiopatías dilatadas hereditarias (40). El rendimiento es similar en el estudio de pacientes con errores innatos del metabolismo (41).

En trastornos severos del neurodesarrollo y las ataxias de inicio en la edad pediátrica el rendimiento diagnóstico del exoma es de alrededor del 40 % (42,43). En el estudio de encefalopatías epilépticas y epilepsias sindrómicas se logra un rendimiento diagnóstico del superior al 40 % (44,45).

Los trastornos neurológicos secundarios a las mutaciones de un solo gen son un grupo extremadamente heterogéneo de enfermedades, individualmente raras, y a menudo se asocian con discapacidad progresiva y severa. Dado el grado de heterogeneidad clínica y genética, la secuenciación de nueva generación se ha convertido en una herramienta de diagnóstico importante. También hay pacientes con enfermedades neurológicas causadas por enfermedades genéticas aún no identificadas, para estos individuos, será necesario realizar más estudios para identificar y caracterizar estos nuevos genes de enfermedades con la traslación de este conocimiento a la clínica (46).

Tabla 2. Resumen de los artículos seleccionados para la revisión narrativa

Ref	Título del estudio	Tipo de enfermedad estudiada	Número de casos analizados	Rendimiento Diagnóstico (%)
(31)	Whole-exome sequencing for diagnosis of hereditary ichthyosis.	Ictiosis hereditaria	34	79.4
(32)	Improved diagnostic yield of neuromuscular disorders applying clinical exome. sequencing in patients arising from a consanguineous population.	Enfermedades neuromusculares	45	73
(34)	Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders.	Trastornos neurometabólicos	41	68
(47)	SpainUDP: TheSpanishUndiagnosed Rare Diseases Program	Pacientes con signos y síntomas clínicos que no identificables o atribuibles a un trastorno conocido, a pesar de extensas investigaciones clínicas con retardo mental, trastorno del movimiento, encefalopatía epiléptica, talla baja	30	67
(35)	The impact of next-generation sequencing on the diagnosis of ediatric-onset hereditary spastic paraplegias: new genotype-phenotype correlations for rare HSP-related genes.	Paraplejía espástica hereditaria	47	62
(39)	Genetic landscape of Rett syndrome-like phenotypes revealed by whole exome sequencing	Síndrome Rett-like	77	50.6
(36)	Diagnostic Yield of Whole Exome Sequencing in Pediatric Dilated Cardiomyopathy.	Miocardiopatía dilatada pediátrica	21	50
(37)	Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing	Errores innatos del metabolismo	102	50
(44)	Diagnostic exome sequencing of syndromic epilepsy patients in clinical practice	Epilepsia síndrónica	86	49
(38)	Enhanced diagnostic yield in Meckel-Gruber and Joubert syndrome through exome sequencing supplemented with split-read mapping.	Síndrome de Meckel Gruber y síndrome de Joubert	26	46
(43)	The role of recessive inheritance in early-onset epileptic encephalopathies: a combined whole-exome sequencing and copy number study.	Encefalopatías epilépticas	63	42
(40)	Whole exome sequencing in neurogenetic odysseys : An effective , cost- and time-saving diagnostic approach.	Enfermedades neurogenéticas	40	40
(41)	Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders : toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test	Trastornos severos del neurodesarrollo	43	32,5
(45)	Diagnostic yield of genetic testing in 324 infants with hypotonia	Hipotonía	134	3
(42)	Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia	Ataxia de inicio en edad pediátrica	42	30
(29)	Exome sequencing in routine diagnostics: a generic test for 254 patients with primary immunodeficiencies	Inmunodeficiencias	254	28
(30)	Utility and limitations of exome sequencing in the molecular diagnosis of pediatric inherited platelet disorders	Trastornos hereditarios de las plaquetas	21	23.8

Estudio reiterado del exoma (Repeated exome analysis)

Los estudios sobre análisis reiterado del exoma tienen en común poblaciones grandes con patologías diversas. En un estudio con 1133 pacientes el segundo análisis del exoma elevó el rendimiento diagnóstico del 27 % al 40 %, reportado por el mismo grupo en la misma población de estudio (47). En otro estudio de 1059 pacientes, se aumentó el número de casos diagnosticados en 44 pacientes, el rendimiento diagnóstico se incrementó en 4,2 % con respecto al análisis inicial (48). En el reporte de análisis de un grupo mixto de enfermedades con patrón mendeliano, el rendimiento diagnóstico fue 26 % y aumentó a 28 % en el segundo análisis (49).

En el estudio de Nambot se hicieron 2 análisis reiterados del exoma con diferencia de un año el análisis inicial dio un rendimiento diagnóstico de 22 %, la primera revisión del análisis mejoró el rendimiento hasta 22.7 % y en la segunda revisión el rendimiento diagnóstico subió a 27.4 % para un aumento final del 5.4 % del rendimiento diagnóstico (50).

Conclusiones

El exoma es una tecnología de secuenciación genética de nueva generación recomendable como estudio diagnóstico de primera línea en pacientes con ER con una media de rendimiento diagnóstico mayor que el observado en enfermedades genéticas comunes.

Parece ser que el rendimiento diagnóstico del exoma es mayor en pacientes con ER en las que el compromiso es predominantemente neurológico. El análisis reiterado del exoma podría beneficiar a pacientes a quienes no se les hecho el diagnóstico definitivo de una ER.

Conflictos de interés

La autora de esta revisión declara no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

- Organización Mundial de la Salud (OMS). Sitio web de la OMS [Internet]. Ginebra: OMS; [citado en 20 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/bulletin/volumes/90/6/12-020612/es/>.
- RDCRN - National Institutes of Health. FACT SHEET - Rare Diseases Clinical Research Network [Internet]. 2010. Disponible en: <https://www.rarediseasesnetwork.org/about/index.htm>.
- EURORDIS. What is a rare disease? Eurordis - Rare Diseases Europe [Internet]. Disponible en: <http://www.eurordis.org/about-rare-diseases>.
- Orphanet. Procedural document on Epidemiology of rare disease in Orphanet (Prevalence, incidence and number of published cases or families). Orphanet [Internet]. Febrero 2019; Versión 01. Disponible en: https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Epidemiology_in_Orphanet_R1_Ann_Epi_EP_05.pdf.
- Kaufmann P, Pariser AR, Austin C. From scientific discovery to treatments for rare diseases - The view from the National Center for Advancing Translational Sciences - Office of Rare Diseases Research. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):1-9.
- Herder M. What Is the Purpose of the Orphan Drug Act? *PLoS Med*. 2017;1-5.
- European Parliament. REGULATION (EC) No 141/2000 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 1999 on orphan medicinal products. European Commission [Internet]. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol1/reg_2000_141/reg_2000_141_es.pdf
- GlobalGenesProject. Rare diseases: facts and statistics. *Global Genes* [Internet]. 2017. Disponible en: <https://globalgenes.org/rare-diseases-facts-statistics/>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Priorización de medicamentos para enfermedades raras. OMS [Internet]. Disponible en: https://www.who.int/medicines/areas/priority-medicines/Ch6_19Rare.pdf.
- Ministerio de Salud y Protección Social (MinSalud). Ley 1392 de 2010. Ministerio de Salud y Protección Social [Internet]. Fecha desconocida. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/ley-1392-de-2010.pdf>.
- Pareja Arcila ML. Situación actual de las enfermedades huérfanas en Colombia 2017. *Rev CES Derecho*. 2017;231-41.
- Martinez JC, Misnaza SP. Mortalidad por enfermedades huérfanas en Colombia, 2008-2013. *Biomédica*. 2018;38(2):198-208.
- OMIM. Gene Map Statistics. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [Internet]. Fecha desconocida. Disponible en: <https://www.omim.org/statistics/geneMap>.
- Hartley T, Balci TB, Rojas SK, Eaton A, Canada C, Dymment DA, et al. The unsolved rare genetic disease atlas? An analysis of the unexplained phenotypic descriptions in OMIM®. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2018;178(4):458-63.
- Rath A, Aymé S, Bellet B. Classification of rare diseases: a worldwide effort to contribute to the International Classification of Diseases. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(S1):2010.
- Rosell AM, Pena LDM, Schoch K, Spillmann R, Sullivan J, Hooper SR, et al. Not the End of the Odyssey : Parental Perceptions of Whole Exome Sequencing (WES) in Pediatric Undiagnosed Disorders. *J Genet Couns* [Internet]. 2016;1019-31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10897-016-9933-1>.
- Hutchison CA. DNA sequencing: Bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(18):6227-37.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2010;11(1):31-46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069>.
- Wallace SE, Bean LJ. Educational Materials-Genetic Testing: Current Approaches. En: *Prenatal Diagnosis* [Internet]. 1993. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.
- Wallace SE, Bean LJH. Educational Materials — Genetic Testing : Current Approaches. 2017 Mar 14 [Updated 2018 Feb 12] In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., Editors. *GeneReviews*®. Seattle,WA: University of Washington, Seattle;1993-2019; 2018. 1-13 p.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(45). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2768590/pdf/zpq19096.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/5DF4BB8B-64A5-4CDA-BAEE-C83FF8366912>.
- Berg AO, Berg JS, Brown CW, Burke W, Calonge BN, Chung WK, et al. An evidence framework for genetic testing. *An Evidence Framework for Genetic Testing*. 2017. 1-136 p.

23. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Veeraraghavan N, et al. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical WholeExome Sequencing. *JAMA*. 2014;312(18):1870–9.
24. Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Original Research Article Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses : implications for providers. *Genet Med*. 2017;19(2).
25. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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):405–24.
26. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. En: Bamshad MJ, editor. *Medical Genetics [Internet]*. 2015; p. 199-215.
27. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. Vol. 10, *Nature Reviews Genetics*. 2009. p. 57–63.
28. Gonorazky HD, Naumenko S, Ramani AK, Nelakuditi V, Mashouri P, Wang P, et al. Expanding the Boundaries of RNA Sequencing as a Diagnostic Tool for Rare Mendelian Disease. *Am J Hum Genet [Internet]*. 2019;104(3):466–83. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.01.012>.
29. Arts P, Simons A, Alzahrani MS, Yilmaz E, Alidrisi E, Van Aerde KJ, et al. Exome sequencing in routine diagnostics: A generic test for 254 patients with primary immunodeficiencies. *Genome Med*. 2019;11(1):1–15.
30. Fattahi Z, Kalhor Z, Fadaee M, Vazehan R, Parsimehr E, Abolhassani A. Improved diagnostic yield of neuromuscular disorders applying clinical exome sequencing in patients arising from a consanguineous population. 2017;386–402.
31. Romasko EJ, Devkota B, Biswas S, Jayaraman V, Jairam S, Scarano MI, et al. Utility and limitations of exome sequencing in the molecular diagnosis of pediatric inherited platelet disorders. *Am J Hematol*. 2018;93(1):8–16.
32. Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, et al. Diagnostic impact and cost-effectiveness of whole-exome sequencing for ambulant children with suspected monogenic conditions. *JAMA Pediatr*. 2017;171(9):855–62.
33. Gahl WA, Markello TC, Toro C, Fajardo KF, Sincan M, Gill F, et al. The national institutes of health undiagnosed diseases program: Insights into rare diseases. *Genet Med*. 2012 Jan 1;14(1):51–9.
34. López-Martín E, Martínez-Delgado B, Bermejo-Sánchez E, Alonso J. SpainUDP: The Spanish undiagnosed rare diseases program. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(8):1–17.
35. Sitek JC, Kulseth MA, Rypdal KB, Skodje T, Sheng Y, Retterstøl L. Whole-exome sequencing for diagnosis of hereditary ichthyosis. 2018;1022–7.
36. Mazzucato M, Visonà L, Pozza D, Manea S, Minichiello C, Facchin P. A population-based registry as a source of health indicators for rare diseases : the ten-year experience of the Veneto Region ' s rare diseases registry. 2014;1–13.
37. Schofield D, Alam K, Douglas L, Shrestha R, Macarthur DG, Davis M, et al. Cost-effectiveness of massively parallel sequencing for diagnosis of paediatric muscle diseases. *Genomic Med*. 2017;2(4).
38. Tarailo-graovac M, Wasserman WW, Karnebeek CDM Van, Wasserman WW, Karnebeek CDM Van. Impact of next-generation sequencing on diagnosis and management of neurometabolic disorders : current advances and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn [Internet]*. 2017;17(4):307–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2017.1293527>.
39. Balicza P, Grosz Z, Gonzalez MA, Bencsik R, Pentelenyi K, Gal A, et al. Journal of the Neurological Sciences Genetic background of the hereditary spastic paraplegia phenotypes in Hungary — An analysis of 58 probands. 2019;364(2016):116–21.
40. Long P, Evans J, Olson T. Diagnostic Yield of Whole Exome Sequencing in Pediatric Dilated Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2017;4(4):11.
41. Ghosh A, Schlecht H, Heptinstall LE, Bassett JK, Cartwright E, Bhaskar SS, et al. Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing. *Arch Dis Child*. 2017;102(11):1019–29.
42. Thevenon J, Duffourd Y, Lefebvre M, Feillet F, Steinmetz A, Huet F, et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin Genet*. 2016;89:700–707.
43. Sawyer SL, Schwartzentruber J, Beaulieu CL, Dymont D, Smith A, Warman Chardon J, Yoon G, Rouleau GA, Suchowersky O, Siu V, Murphy L, Hegele RA, Marshall CR; FORGE Canada Consortium; Bulman DE, Majewski J, Tarnopolsky M, Boycott KM. Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia. *Hum Mutat*. 2014 Jan;35(1):45–9. doi: 10.1002/humu.22451. PMID: 24108619; PMCID: PMC4255313.
44. Papuc SM, Abela L, Steindl K, Begemann A, Simmons TL, Schmitt B, et al. The role of recessive inheritance in early-onset epileptic encephalopathies: a combined whole-exome sequencing and copy number study. *Eur J Hum Genet [Internet]*. 2019;408–421. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41431-018-0299-8>.
45. Tumiené B, Writzl AMK, Hodzic A, uturilo G, Kuzmani R, Culic V, et al. Diagnostic exome sequencing of syndromic epilepsy patients in clinical practice. *Clin Genet*. 2018;93(September 2017):1057–62.
46. Warman Chardon J, Beaulieu C, Hartley T, Boycott KM, Dymont DA. Axons to Exons: the Molecular Diagnosis of Rare Neurological Diseases by Next-Generation Sequencing. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015;15(9):1–9.
47. Wright CF, Mcrae JF, Clayton S, Gallone G, Fitzgerald TW, Jones P, et al. Europe PMC Funders Group Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1133 families with developmental disorders. 2018;20(10):1216–23.
48. Bergant G, Maver A, Lovrecic L, Cuturilo G, Hodzic A, Peterlin B. Comprehensive use of extended exome analysis improves diagnostic yield in rare disease: a retrospective survey in 1, 059 cases. *Genet Med*. 2018;20(3).
49. Lee H, Deignan J, Dorrani N, Strom S, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of rare Mendelian Disorders. *JAMA*. 2014;312(18):1880–7.
50. Nambot S, Thevenon J, Kuentz P, Duffourd Y, Tisserant E, Bruel A, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of rare disorders with congenital anomalies and / or intellectual disability : substantial interest of prospective annual reanalysis. *Genet Med [Internet]*. 2017;20(6):645–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2017.162>.
51. Orphadata. Orphadata: a platform for rare disease data management and epidemiological research [Internet]. Fecha desconocida. Disponible en: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=EN>.