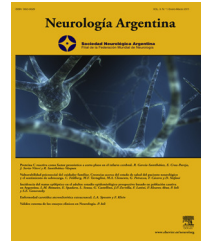




Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Artículo especial

Diagnóstico genómico en neurología clínica



Marta Córdoba y Marcelo Andrés Kauffman*

Consultorio y Laboratorio de Neurogenética, Hospital J.M. Ramos Mejía, IBCN Eduardo de Robertis UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 18 de mayo de 2015

Aceptado el 1 de julio de 2015

On-line el 22 de agosto de 2015

Palabras clave:

Secuenciación genómica

Exoma

Panel de genes

Secuenciación genómica de nueva generación

R E S U M E N

Introducción: El uso clínico de la secuenciación genómica masiva permitió en los últimos años conocer la etiología genética de diversos trastornos. Resulta útil para el estudio de familias con varios individuos afectados así como en casos aislados. Además, la transición entre la investigación y la clínica sucede de manera rápida. El campo de las enfermedades neurológicas resulta propicio para el uso diagnóstico de estas tecnologías.

Objetivo: Describir y discutir la evidencia actual de la utilidad diagnóstica de la secuenciación genómica masiva en el campo de las enfermedades neurológicas.

Desarrollo: Describiremos especialmente la utilidad del diagnóstico genómico (secuenciación de genoma, exoma y/o paneles de genes) en ataxias, neuropatías hereditarias, enfermedades neuromusculares, trastorno generalizado del desarrollo, enfermedades mitocondriales, epilepsia y paraparesias espásticas. Discutiremos en cada una de ellas la evidencia bibliográfica publicada hasta la fecha.

Conclusiones: La secuenciación genómica masiva muestra una utilidad diagnóstica de alrededor del 40% según el grupo de patología. Es una prueba accesible que resulta costo efectiva en patologías de difícil diagnóstico. Dilucidar la etiología molecular de una enfermedad es el primer paso para la investigación y posterior aplicación clínica de tratamientos en el futuro.

© 2015 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Genomic diagnosis in clinical neurology

A B S T R A C T

Introduction: Widespread use of next generation sequencing has led to a better understanding of the genetic causes of many neurological diseases. They are useful for the study of multiple affected families and isolated cases as well. Considering that the transition between research and clinics have occurred at a fast pace, neurological diseases could be highlighted as specially suitable for the diagnostic use of these technologies.

Aim: To describe and discuss the current evidence supporting the diagnostic utility of next generation sequencing in the field of neurological diseases.

Keywords:

Genomic sequencing

Exome

Gene panel

Next generation sequencing

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marcelokauffman@gmail.com (M. Andrés Kauffman).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2015.07.001>

1853-0028/© 2015 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Development: Particularly, we describe the utility of genomic diagnosis (sequencing of the genome, exome and/or panels of genes) in ataxias, hereditary neuropathies, myopathies, neurodevelopmental disorders, mitochondrial diseases, epilepsy and spastic paraparesis. We discuss the evidence published so far.

Conclusions: Next generation sequencing showed a diagnostic yield of about 40% depending on the disease group. It is an accessible and cost effective technology for difficult to diagnose conditions. Elucidating the molecular etiology of a disease is the first step for research and subsequent clinical application of treatments in the future.

© 2015 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La disponibilidad reciente de las técnicas de secuenciación genómica masiva o de *próxima generación* (NGS, por sus iniciales en inglés) ha significado un aumento exponencial en el conocimiento de las etiologías genéticas de las enfermedades raras o poco frecuentes^{1,2}. Estas técnicas tienen aplicación en el estudio de todo el genoma o de partes seleccionadas del mismo (secuenciación del exoma y paneles de genes)³. La NGS no sólo es útil en el estudio de grandes familias extendidas con múltiples sujetos afectados por un mismo trastorno, sino que también lo es en pacientes esporádicos, donde pueden detectarse alteraciones en genes previamente reconocidos como etiopatogénicos o noveles.

Actualmente, se aplica tanto en la investigación como en el ámbito clínico, merced a una rápida transición de los hallazgos de la investigación a las aplicaciones de diagnóstico⁴. Esta tecnología aplicada puede ayudar en gran medida a reducir al mínimo la «odisea diagnóstica» sufrida por los pacientes afectados por trastornos poco prevalentes, ya que la secuenciación se puede obtener en un tiempo y a un costo razonables⁵.

Considerando al campo de la neurología como un escenario propicio para el uso diagnóstico de NGS^{6,7}, donde además ha habido una acumulación reciente de un gran número de estudios que han evaluado el uso diagnóstico de esta tecnología en la especialidad (tabla 1), creemos oportuna una descripción y discusión de la evidencia actual que sustenta el diagnóstico genómico en diferentes grupos de enfermedades neurológicas.

Desarrollo

Ataxias

Las ataxias cerebelosas progresivas crónicas representan un grupo diverso de trastornos neurológicos. Sus causas van desde etiologías comunes adquiridas hasta condiciones genéticas raras. Existe heterogeneidad genética causal, que se acompaña además de una superposición de fenotipos clínicos. Esto convierte en un reto el diagnóstico genético de estos pacientes, tanto en las formas familiares como en las esporádicas.

A finales del 2014 y en el mes de febrero del 2015 fueron publicadas 3 amplias series de casos de pacientes con ataxia

donde se utilizó secuenciación exómica con fines diagnósticos.

En la primera, Fogel et al. sobre 76 pacientes estudiados reportan que se identificó información genética clínicamente relevante en más del 60% de los pacientes (n = 46), incluyendo hallazgos en genes previamente reconocidos como causantes de enfermedad en un 21% (n = 16)⁸.

En la segunda, Pyle et al. estudiaron a 35 pacientes provenientes de 22 familias seleccionadas al azar. En este trabajo lograron definir el diagnóstico molecular en 14 de las 22 familias (64%) estudiadas, revelando mutaciones de novo dominantes y nuevas mutaciones en genes previamente descritos en familias aisladas, y expandiendo el fenotipo que genes previamente conocidos pueden provocar. Por otro lado, destacan que el rendimiento diagnóstico fue independiente del grupo etario y de la presencia de antecedentes familiares de ataxia⁹.

En la tercera, se estudió a 28 pacientes, mediante secuenciación exómica, que habían instalado ataxia en edad pediátrica. Se obtuvo un diagnóstico molecular en 13, representando un rédito diagnóstico de un 46%¹⁰.

Los estudios mencionados, junto a reportes de casos¹¹ o familias individuales, demuestran la notoria utilidad diagnóstica de las técnicas de secuenciación genómica en este grupo de pacientes, por lo que puede considerarse una herramienta apropiada en la evaluación diagnóstica rutinaria de este grupo de enfermos.

Miopatías

Es conocido que las enfermedades neuromusculares representan un grupo numeroso y altamente heterogéneo, tanto desde el punto de vista clínico como genético. Tal heterogeneidad convierte su diagnóstico en complicado, costoso y requiriendo de múltiples pruebas.

Según el subgrupo de patología, existe reciente evidencia acerca de la utilidad de la secuenciación genómica a partir de lo reportado tanto en series de casos pequeñas como en casos y familias individuales¹².

Nos parece pertinente mencionar al trabajo de Ankala, en el que se comparó retrospectivamente la eficacia del estudio de un solo gen candidato vs. el uso de paneles de genes específicos (por secuenciación genómica) en diversas enfermedades neuromusculares. Los paneles de genes mostraron 3 veces más rendimiento diagnóstico (46%) que el estudio molecular de un solo gen¹³.

Tabla 1 – Publicaciones seleccionadas

Año y revista	Publicación	Grupo de enfermedad
2014, JAMA	«Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia» ⁸	Ataxia
2015, Brain	«Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias» ⁹	Ataxia
2014, Human Mutation	«Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia» ¹⁰	Ataxia
2015, Annals of Neurology	«A comprehensive genomic approach for neuromuscular diseases gives a high diagnostic yield» ¹³	Neuromuscular
2015, Journal of Medical Genetics	«Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders» ¹⁴	Neuromuscular
2014, Nature	«Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability» ¹⁹	TGD
2014, Lancet	«Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: A scalable analysis of genome-wide research data» ²⁰	TGD
2014, JNNP	«Application of whole exome sequencing in undiagnosed inherited polyneuropathies» ¹⁷	Neuropatía
2015, Annals of Neurology	«Increased yield of exome sequencing by off-target mitochondrial DNA analysis» ²⁹	Mitochondrial
2014, JAMA	«Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies» ²⁵	Mitochondrial
2013, Nature	«De novo mutations in epileptic encephalopathies» ³¹	Epilepsia
2015, Epilepsia	«Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood» ³³	Epilepsia
2014, Journal of Neurology	«Targeted next generation sequencing in SPAST-negative hereditary spastic paraplegia» ²²	Paraparesia espástica
2014, Science	«Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders» ²³	Paraparesia espástica

Dichos resultados coinciden con los reportados por Chae, donde se obtuvo un 48,8% de eficacia diagnóstica en el estudio de pacientes con enfermedad neuromuscular de instalación temprana mediante el uso de un panel que analizaba 579 genes conocidos como causantes de miopatías¹⁴.

Ambos trabajos concluyeron que el uso diagnóstico de paneles de genes debe ser considerado de primera línea en este grupo de patologías.

Neuropatías

Las neuropatías hereditarias (IPN) representan un grupo de enfermedades relacionadas, incluyen las neuropatías sensitivas hereditarias, neuropatías motoras hereditarias, y las neuropatías sensitiva-motoras agrupadas en las distintas entidades que son denominadas como diferentes subtipos de Charcot-Marie-Tooth (CMT). En consecuencia, es amplia la heterogeneidad genética y clínica en las IPN. Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en más de 80 genes que causan CMT y trastornos relacionados¹⁵. La heterogeneidad clínica incluye tanto la variación fenotípica entre las diferentes familias con mutaciones en el mismo gen (interfamiliar) como la variación dentro de las familias individuales, donde todas las personas llevan la misma mutación del gen (intrafamiliar). Las mutaciones en diferentes genes también pueden causar fenotipos similares (heterogeneidad loci). Dicha heterogeneidad torna dificultosa la aproximación diagnóstica molecular de este grupo de trastornos, merced a los tiempos y costos que tradicionalmente ha requerido. Recientemente, Rudnik-Schöneborn et al., en un estudio de 1.330 pacientes afectados por CMT, obtuvieron un rédito diagnóstico mediante secuenciación exómica de un 56% en el grupo de

neuropatía desmielinizante (CMT1/CMTX) y de un 24% para axonal (CMT2/CMTX)¹⁶. En otro trabajo publicado por Klein et al. sobre un grupo heterogéneo de 24 pacientes con neuropatía hereditaria, pertenecientes a 15 familias, se pudo arribar a un diagnóstico etiológico en 5 familias, ampliándose además el fenotipo conocido sobre un mismo gen en algunos casos¹⁷.

Trastornos del espectro autista

Este grupo de trastornos comprende un conjunto de entidades donde la presentación clínica es sumamente variada, donde además de los trastornos conductuales y de la comunicación que los caracterizan pueden coexistir diferentes grados de retraso mental, epilepsia y déficit neurológicos focales en menor proporción¹⁸. Dos publicaciones recientes revelaron la importancia de la etiología genética en este tipo de trastornos. En una de ellas, publicada por Gilissen et al.¹⁹, se estudiaron 50 tríos (paciente afectado, padres sanos) mediante secuenciación del genoma completo. Luego del análisis se pudo arribar al diagnóstico etiológico molecular en 20 pacientes, alcanzándose en consecuencia una tasa diagnóstica de un 42%.

La otra publicación, de Wright et al., corresponde a un estudio multicéntrico llevado a cabo en el Reino Unido. En el denominado *Deciphering Developmental Disorders Study*²⁰ se analizó la información genética de 1.133 tríos mediante el uso de estudios genómicos (aCGH, exomas y genomas completos), reportándose un rendimiento diagnóstico de un 27%.

Ambos estudios superan la eficacia diagnóstica reportada en trabajos publicados años atrás y brindan evidencia para apoyar un uso extendido de técnicas de diagnóstico genómico

en la asistencia de los pacientes afectados por este heterogéneo grupo de trastornos.

Paraparesias espásticas

Las paraparesias espásticas hereditarias (HSP) son un grupo de enfermedades genéticas en las que la parálisis espástica de miembros inferiores es la principal característica clínica. Esto es causado por una degeneración axonal distal relativamente selectiva que implica a los axones más largos de los tractos corticoespiniales. Aunque las mutaciones en el gen SPAST (SPG4) explican aproximadamente el 40% de las formas autosómico dominantes puras, el diagnóstico molecular puede ser un reto para las formas recesivas y esporádicas, que a menudo son complicadas y clínicamente se superponen con un amplio número de trastornos del movimiento²¹. Por ejemplo, SPG11 puede acompañarse de retraso mental, parkinsonismo, ataxia, adelgazamiento de cuerpo calloso entre otros signos y síntomas. Dichos hallazgos pueden estar presentes en otros 9 tipos de paraparesias, como SPG7, SPG18 y SPG21. En este contexto de superposición clínica y genética la secuenciación genómica aparece como una herramienta útil, tal como lo presentado recientemente por nosotros⁷. En otro estudio realizado por Kumar et al. luego de separar a una población de 27 pacientes SPAST negativos, se realiza secuenciación de paneles de genes según modelo de herencia, arribándose a un diagnóstico en un 25,9% de los casos²². En un trabajo posterior de Novarino et al. sobre 55 familias afectadas, mediante el uso de secuenciación exómica combinado con análisis de redes moleculares, se obtuvo un rédito diagnóstico de un 75% incluyendo genes conocidos y genes validados funcionalmente en modelos experimentales. Este tipo de análisis permitió además establecer vías moleculares en común con otras enfermedades neurodegenerativas y la comprensión de mecanismos fisiopatológicos que son críticos para la salud axonal²³.

Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales pueden estar causadas por alteraciones en genes nucleares que regulan la función mitocondrial y por mutaciones en el genoma mitocondrial propiamente dicho. Las mutaciones del ADN mitocondrial incluyen mutaciones puntuales, ya sea homo o heteroplásmicas, y reordenamientos a gran escala. Diferentes mutaciones puntuales heteroplásmicas pueden dar lugar a diferentes fenotipos clínicos, incluyendo algunos síndromes canónicos como MELAS, MERRF, NARP y el síndrome de Leigh. La principal enfermedad asociada a mutaciones homoplásmicas es la neuropatía óptica hereditaria de Leber. Por otra parte, reordenamientos (deleciones individuales o duplicaciones) son responsables de oftalmoplejía externa progresiva esporádica, síndrome de Kearns-Sayre y el síndrome de Pearson²⁴.

Respecto a los trastornos causados por mutaciones en genes nucleares, un estudio de Taylor et al. sobre 53 pacientes con evidencia de deficiencias en la cadena respiratoria sin mutaciones primarias en el ADN mitocondrial, mostró un rédito diagnóstico de un 60% mediante secuenciación exómica²⁵. Otro trabajo de Wortmann et al., en un grupo heterogéneo de 109 pacientes con sospecha de enfermedad

mitocondrial, arribó a un diagnóstico en el 39% de los casos, a través del análisis de un panel amplio de genes candidatos como primer paso y exoma completo como segundo paso²⁶.

NGS es útil además para secuenciar el genoma mitocondrial y en una misma prueba cuantificar heteroplasmia. Dicha información se puede obtener mediante el uso pirosecuenciación (454)²⁷ o la plataforma Illumina²⁸. Clásicamente, por Sanger, es necesario realizar un procedimiento extra para cuantificar heteroplasmia.

En el último año ha cobrado importancia creciente el estudio de secuenciación exómica con «análisis del ADN mitocondrial por fuera del objetivo»²⁹. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, es posible analizar la información nuclear y mitocondrial simultáneamente. Esto condujo a la aplicación cada vez más frecuente de esta tecnología en el caso de pacientes con sospecha de este grupo de enfermedades³⁰.

Epilepsia

Las encefalopatías epilépticas infantiles, como el síndrome de Dravet, el síndrome Ohtahara, el síndrome de West, el síndrome de Lennox-Gastaut, la epilepsia mioclónica astática y el síndrome de Landau-Kleffner, representan causas devastadoras de epilepsia. Aunque desde hace tiempo se sospecha una herencia compleja en epilepsia, los datos recientes indican que muchos trastornos epilépticos raros se deben a una mutación en un gen único. En la mayoría de los casos las mutaciones causales son dominantes de novo³¹. Por ejemplo, el síndrome de Dravet se debe principalmente a mutaciones de novo en SCN1A. Para el grupo heterogéneo y de difícil caracterización fenotípica de las encefalopatías de inicio temprano, se realizó una nueva clasificación en 5 tipos diferentes según la etiología genética: EIEE1 por el gen ARX, EIEE2 por CDKL5/STK9, EIEE3 por CG1/SLC25A22, EIEE4 por STXBP1 y EIEE5 por SPTAN1³².

Pocas áreas han sufrido el impacto de la secuenciación genómica masiva como las encefalopatías epilépticas. En un trabajo reciente de Mercimek-Mahmutoglu et al. sobre 110 pacientes con epilepsia intratable, retraso madurativo global y deficiencias cognitivas, previamente estudiados, sumando el uso de paneles de genes conocidos por NGS, se aclaró la etiología en el 28% de los casos, aumentándose la tasa diagnóstica de menos de un 10% a más de un 25%³³.

Con el advenimiento de NGS, en los últimos 5 años se han descubierto las etiologías moleculares de numerosos síndromes y gracias a esto se han abierto las puertas a posibles aplicaciones terapéuticas como pocas veces ocurre³⁴.

Conclusiones

El diagnóstico genómico en el campo de las enfermedades neurológicas es una realidad asible localmente y en el mundo³⁵. La utilidad diagnóstica de las pruebas de secuenciación varía entre los diferentes grupos, encontrándose en alrededor del 30%-40%. Estas cifras no resultan despreciables, teniendo en cuenta que a través de una sola prueba se puede dilucidar la etiología molecular de enfermedades de difícil diagnóstico, que no en pocas ocasiones requieren numerosos estudios y llevan largo tiempo sin resolverse.

Probablemente, con el paso del tiempo, la utilidad diagnóstica de la secuenciación genómica masiva aumente aún más debido a avances en la tecnología, al descubrimiento de nuevos genes, a la mayor comprensión de mecanismos de variabilidad genética, a la mejora en la disponibilidad y el acceso a bases de datos y al diseño de herramientas bioinformáticas más eficaces para el análisis de la información. Estamos situados en un presente donde conocer la causa es el objetivo principal. Esto pone fin a la incertidumbre diagnóstica de años que atraviesan nuestros pacientes y sus familias³⁶. Nos prepara también para un futuro desafiante en el que conocer la causa es el primer paso para posibles tratamientos.

Financiación

Este trabajo recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nguyen MT1 CK. The clinical utility of whole-exome sequencing in the context of rare diseases —the changing tides of medical practice. *Clin Genet*. 2014 [Epub ahead of print].
2. Iglesias A, Anyane-Yeboah K, Wynn J, Wilson A, Wilson A, Truitt Cho M, et al. The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. *Genet Med*. 2014;16:922-31.
3. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15:733-47.
4. Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol*. 2012;71:5-14, <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22647>.
5. Johansen Taber KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Intern Med*. 2014;174:275-80.
6. Guerreiro R, Brás J, Hardy J, Singleton A. Next generation sequencing techniques in neurological diseases: Redefining clinical and molecular associations. *Hum Mol Genet*. 2014;44:1-7.
7. Córdoba M, González Morón D, Rodríguez Quiroga SA, Kauffman MA. Neurología genómica personalizada. *Neurol Argentina*. 2014;6:27-136.
8. Fogel BL, Lee H, Deignan JL, Strom SP, Kantarci S, Wang X, et al. Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA Neurol*. 2014;71:1237-46.
9. Pyle A, Smertenko T, Bargiela D, Griffin H, Duff J, Appleton M et al. Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain*. 2015. 138:276-83.
10. Sawyer SL, Schwartzentruber J, Beaulieu CL, Dymment D, Smith A, Warman Chardon J, et al. Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia. *Hum Mutat*. 2014;35:45-9.
11. Córdoba M, Rodríguez-Quiroga S, Gatto EM, Alurralde A, Kauffman MA. Ataxia Plus Myoclonus in a 23-year-old patient due to STUB1 mutation. *Neurology*. 2014;15(83(3)):287-8.
12. Nigro V, Piluso G. Next generation sequencing (NGS) strategies for the genetic testing of myopathies. *Acta Myol*. 2012;31:196-200.
13. Ankala AHM. A comprehensive genomic approach for neuromuscular diseases gives a high diagnostic yield. *Ann Neurol*. 2015;77:206-14.
14. Chae JHHS. Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders. *J Med Genet*. 2015;52:208-16.
15. Timmerman V, Strickland AV, Zuchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the human genome project success. *Genes (Basel)*. 2014;5:13-32.
16. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511:344-347.
17. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet*. 2014. 385(9975):1305-14.
18. Timmerman V, Strickland AV, Zuchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the human genome project success. *Genes*. 2014;5:13-32.
19. Rudnik-Schöneborn S, Tölle D, Senderek J, Eggermann K, Elbracht M, Kornak U, et al. Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clin Genet*. 2015. [Epub ahead of print].
20. Klein CJ, Middha S, Duan X, Wu Y, Litchy WJ, Gu W, et al. Application of whole exome sequencing in undiagnosed inherited polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:1265-72.
21. Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: Clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*. 2014;261:518-39.
22. Kumar KR, Blair NF, Vandebona H, Liang C, Ng K, Sharpe DM, et al. Targeted next generation sequencing in SPAST-negative hereditary spastic paraplegia. *J Neurol*. 2013;260: 2516 -2522.
23. Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, Hofree M, Silhavy JL, Heiberger AD, et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* 2014;343:506 -511.
24. Kauffman MA. Tres preguntas y una respuesta: algoritmo diagnóstico molecular en enfermedades mitocondriales. *Neurol Argentina*. 2013;1.
25. Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J He L, et al. Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA*. 2014;312:68 -77.
26. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inher Metab Dis*. 2015;38:437-43.
27. Kauffman MA, González-Morón D, Consalvo D, Westergaard G, Vazquez M, Mancini E, et al. Diagnosis of mitochondrial disorders applying massive pyrosequencing. *Mol Biol Rep*. 2012;39:6655 -6660.
28. Dames S, Eilbeck K, Mao R. A high-throughput next-generation sequencing assay for the mitochondrial genome. *Methods Mol Biol*. 2015;1264:77-88.
29. Griffin H, Pyle A, Chinnery PF. Increased yield of exome sequencing by off-target mitochondrial DNA analysis. *Ann Neurol*. 2015;77:553.
30. Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, et al. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing

- for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:1355-9.
31. Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501:217 -21.
32. Nieh SE, Sherr EH. Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. *Neurotherapeutics*. 2014;11:796 -806.
33. Mercimek-Mahmutoglu S, Patel J, Cordeiro D, Hewson S, Callen D, Donner EJ, et. al. Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia*. 2015;56:707-16.
34. Krook-Magnuson E, Soltesz I. Beyond the hammer and the scalpel: selective circuit control for the epilepsies. *Nat Neurosci*. 2015;18:331-8.
35. Cordoba M, Rodriguez S, Gonzalez-Morón D, Medina N y Kauffman MA. Expanding the spectrum of G.rik2 mutations: intellectual disability, behavioural disorder, epilepsy and dystonia. *Clin Genet*. 2015;87:293-5.
36. AMG. Clinical utility of genetic and genomic services: a position statement of the American College of M.edical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2015;17: 505-7.