



Revisión

Utilidad diagnóstica de la secuenciación de segunda y tercera generación en pacientes con discapacidad intelectual: revisión rápida

Hugo H. Abarca-Barriga^{a,b,c,*} y Flor Vásquez-Sotomayor^{a,c}^a Instituto de Investigaciones de Ciencias Biomédicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú^b Facultad de Medicina Humana, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú^c Servicio de Genética y Errores Innatos del Metabolismo, Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 31 de enero de 2023

Aceptado el 7 de marzo de 2023

Palabras clave:

Discapacidad intelectual
 Secuenciación de segunda generación
 Secuenciación de tercera generación
 Secuenciación de última generación
 Secuenciación de segmentos largos
 Variantes estructurales

RESUMEN

Introducción: la discapacidad intelectual se presenta hasta en el 18% de algunas poblaciones. Las causas son variantes genéticas puntuales y variantes en el número de copias detectadas por la secuenciación de segunda generación y el análisis cromosómico por micromatrices, respectivamente. Sin embargo, se tiene otras variantes, como las estructurales, repetición de trinucleótidos o trastornos de la impronta que solo son detectadas por otras pruebas específicas. La secuenciación de tercera generación tiene el potencial de detectar todas las variantes genéticas. El objetivo es determinar las ventajas de la secuenciación de tercera generación sobre la de segunda generación en pacientes con discapacidad intelectual.

Material y métodos: búsqueda sistemática mediante los tesauros MESH «discapacidad intelectual» y «secuenciación de segunda generación»; así como el término de «secuenciación de tercera generación».

Resultados: se seleccionaron 31 artículos; 9 utilizaron la secuenciación de tercera generación en pacientes con estudios genómicos previos y se encontró que el 40% tenían variantes estructurales. Los que emplearon la secuenciación de segunda generación (n = 22) determinaron mediante un metaanálisis, que detectaron variantes de un solo nucleótido y variantes en el número de copias en un 29,8 y 9,2% de los casos, respectivamente.

Conclusiones: la secuenciación de tercera generación tiene la capacidad de encontrar variantes estructurales, disomías uniparentales, repetición de trinucleótidos y variantes de un solo nucleótido, lo cual permitiría tener una mayor probabilidad de establecer la etiología de la discapacidad intelectual. Sin embargo, se necesitan estudios con muestras más representativas no solo en quienes padecen de discapacidad intelectual, sino a nivel poblacional.

© 2023 The Author(s). Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Utility of second-generation sequencing and third-generation sequencing in the diagnosis of patients with intellectual disability: Rapid review

A B S T R A C T

Keywords:

Intellectual disability
 Second-generation sequencing
 Third-generation sequencing
 Next-generation sequencing
 Long-read sequencing
 Structural variants

Introduction: Some populations have an intellectual disability frequency of nearly 18%. Among, the diverse genetic causes are single nucleotide variants and copy number variations, detected with second-generation sequencing and chromosomal microarray analysis, respectively. Nevertheless, other variants such as structural variants, trinucleotide repeat or imprinting disorders, cannot be detected by these tests and require different specific techniques. Third-generation sequencing have a power of found all variants. The purpose is to establish the benefits of using third-generation sequencing above second-generation sequencing in the diagnosis of patient with intellectual disability.

Material and methods: A rapid systematic review was performed on the Medline using thesaurus terms MESH of “intellectual disability” and “second-generation sequencing”; as well as using the term “third-generation sequencing”.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónicos: hugo.abarca@urp.edu.pe, hugo.abarca@unmsm.edu.pe (H. H. Abarca-Barriga).

Results: 31 articles were selected in total. Of those, nine used third-generation sequencing in patients with previously genomic test, and founded structural variants in 40% of cases, all these variants were corroborated with other gold standard tests. Twenty-two studies used second-generation sequencing ($n = 22$) and showed through metanalysis, that 29,8% and 9,2% of these cases are due a single nucleotide variant and copy number variations, respectively.

Conclusions: Third-generation sequencing can find structural variants, uniparental disomies, trinucleotide repeat and single nucleotide variation. Therefore, it would allow a broader and better study of the etiology of intellectual disability. Nevertheless, more research with larger representative samples in patients and healthy population is needed.

© 2023 The Author(s). Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La discapacidad intelectual (DI), conocida previamente como retraso mental, es el trastorno del neurodesarrollo más frecuente^{1,2}. El diagnóstico se debe realizar en los pacientes que puedan realizar la prueba psicológica correspondiente (usualmente mayores de 5 años) y aquellos menores de 18 años, y se define por presentar limitación en el funcionamiento intelectual, así como dificultades conceptuales, sociales y áreas prácticas de la vida^{1,3}.

La prevalencia de la DI es variable, estimándose entre el 1–3, 3–12,9 y el 18,3% a nivel mundial, latinoamericano y países de bajos o medianos ingresos, respectivamente^{4–8}. La DI tiene un impacto importante a nivel económico y se calcula que los costos de un paciente con DI (en EE. UU. y Europa) está entre 1 y 2 millones de dólares, siendo más costoso que la demencia y el cáncer⁸.

Las causas genéticas de la DI son diversas. Entre ellas se encuentran las variantes en un solo nucleótido (SNV del inglés *single nucleotide variant*), variantes en múltiples nucleótidos (MNV del inglés *multiple nucleotide variant*), variantes en el número de copias (CNV del inglés *copy number variation*), aneuploidías, repetición de trinucleótidos y los rearrreglos complejos⁹.

La secuenciación nueva generación o NGS (*next generation sequencing*), o también conocida como de alto rendimiento, es capaz de determinar la secuencia de bases en una cadena de ADN o ARN de forma paralela (varias cadenas a la vez) y masiva de varias plantillas a partir de una sola muestra, obteniéndose una enorme cantidad de datos¹⁰.

Dentro de las tecnologías de NGS que se usan actualmente para diagnóstico clínico se tiene a la secuenciación de segunda generación (SSG), el cual se caracteriza por hacer lecturas de segmentos cortos de ADN que luego son alineados a un genoma de referencia y empalmados para generar la secuencia completa. Hay varios tipos de SSG, como los de secuenciación de paneles (de decenas a cientos de genes), exoma o WES (*whole exome sequencing*) y genoma o WGS (*whole genome sequencing*)^{11,12}. Pero a pesar de que esta tecnología es en la actualidad ampliamente utilizada en el campo clínico, presenta importantes desventajas, por ejemplo, el genoma al poseer regiones repetitivas, los fragmentos cortos generados por la SSG no se alinean eficientemente y provocan una mala lectura o espacios «no leídos»¹². Además, las variantes de un solo nucleótido o pequeñas delecciones/inserciones pueden ser detectadas a través de esta prueba¹². Mientras que las variantes estructurales largas u otras son más difíciles de detectar a través de la SSG¹².

Considerando estos puntos en contra de la SSG, se ha desarrollado la secuenciación de tercera generación (STG), que secuencia nucleótido por nucleótido, sin amplificación y en tiempo real, obteniendo además fragmentos largos^{10,12}. Asimismo, hace un menor uso de recursos bioinformáticos y obtiene menos sesgos que en la SSG provocados por la amplificación clonal que detecta señales de incorporación de bases durante el uso de la PCR¹⁰.

A la fecha, el número de enfermedades genéticas asociadas a la DI son más de 2.000⁹. Por lo que se ha planteado como primera prueba

de elección en los pacientes con DI la secuenciación de WES^{13,14}. En este sentido, esta podrá detectar SNV en el 31 y 53% de los pacientes con DI aislada y sindrómica respectivamente¹³. Por otro lado, la secuenciación de WGS tiene, además, la posibilidad de detectar no solo SNV, sino CNV, regiones de homocigosidad y rearrreglos cromosómicos¹⁵. Es así que en los pacientes con DI la WGS puede encontrar variantes patogénicas o probablemente patogénicas entre 27 y 62% de los casos^{16–18}.

Se ha reportado que la STG (también conocida como LRS o *long-read sequencing*), puede encontrar variantes en los pacientes con DI que tuvieron pruebas negativas previas, como WES, WGS, análisis cromosómicos por micromatrices o CMA (*chromosomal microarray analysis*) o metilomas¹⁹. Las variantes que detecta la STG incluye las SNV, CNV, rearrreglos cromosómicos complejos y las repeticiones en tándem²⁰.

El objetivo de esta revisión es la de mostrar las ventajas que podría tener la STG de encontrar variantes genéticas en los pacientes con discapacidad intelectual cuyos resultados son negativos cuando se realizan las pruebas genómicas de uso clínico actual, como WES, WGS o CMA.

Material y métodos

Revisión rápida de la literatura sobre el uso de la SSG y STG en el diagnóstico de la discapacidad intelectual.

Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión

- i. Relacionados con el tema a tratar: empleo de secuenciación de segunda y tercera generación en los pacientes con discapacidad intelectual.
- ii. Tipos de estudio:
 - Revisiones sistemáticas, estudios observacionales, pruebas diagnósticas en los estudios con SSG.
 - Revisiones sistemáticas, estudios observacionales, pruebas diagnósticas en los estudios, casos y serie de casos con STG.
- iii. Año de publicación:
 - Todos los estudios de secuenciación de tercera generación.
 - SSG: 2017–2022.
- iv. Idiomas: aquellos publicados en inglés y español.

Criterios de exclusión

Tipos de estudios: cartas al editor, editoriales, comentarios, fichas técnicas, reporte de casos (reportes de segunda generación), revisiones narrativas.

Pregunta PICO: ¿el uso de secuenciación de tercera generación detecta con mayor frecuencia variantes patogénicas que la prueba de segunda generación en pacientes con discapacidad intelectual?

Población: pacientes con discapacidad intelectual.

Exposición: STG.

Comparador: SSG.

Desenlace:

Mayor de detección de variantes patogénicas en un solo nucleótido a través de STG.

Mayor de detección de variantes patogénicas en múltiples nucleótidos a través de STG.

Detección de otras variantes patogénicas.

Fuentes de información

Se revisó la base de datos de MEDLINE/PUBMED. Adicionalmente, se exploró manualmente las publicaciones que citaron los artículos de interés, así como las publicaciones citadas de los mismos estudios.

Estrategia de búsqueda

La estrategia de búsqueda se basó en los términos MeSH (*Medical Subject Headings*), *intellectual disability* y *high throughput DNA sequencing*. El término de *long-read sequencing*, no se encontró como descriptor en MeSH o DeCS; sin embargo, se utilizaron todos los sinónimos que fueron encontrados manualmente en las diferentes publicaciones. Se organizó la búsqueda en 2 grupos finales (Material suplementario 1). Se analizó la literatura en inglés y español. La fecha de búsqueda fue el 17 de septiembre del 2022 y fue actualizada el 22 de septiembre de 2022. Los datos fueron trasladados a Rayyan® para su posterior tamizaje según lectura de título y resumen.

Riesgo de sesgo

Para determinar el riesgo de sesgo y la calidad de los datos de las publicaciones con diseños observacionales SSG se usó la escala de Newcastle-Ottawa modificada por los autores, teniendo un puntaje máximo de 10. Y para los reportes de casos STG se empleó la escala modificada de Murad et al., teniendo un puntaje máximo de 6²¹.

Análisis de datos

De cada uno de los estudios que realizaron la SSG se extrajeron las frecuencias absolutas y relativas de los pacientes con las siguientes variantes genéticas: SNV y CNV patogénicas o probablemente patogénicas. De estos reportes, se hizo un metaanálisis utilizando el programa Jamovi® v. 2.3.18.0, calculando la heterogeneidad, mediante I² y haciendo el diagrama de bosque para ambas variantes genéticas. En aquellos que usaron la STG se realizó la frecuencia absoluta y relativa del total de los estudios.

Resultados

Se encontraron 53 estudios según nuestra estrategia de búsqueda en Medline, al utilizar los criterios de elegibilidad y nuestra pregunta de investigación. Adicionalmente, se encontraron 4 artículos, a partir de las referencias que se incorporaron al análisis (fig. 1). Estas investigaciones fueron exportadas al programa de Zotero®.

Posteriormente, se realizó la lectura a texto completo y basados en los criterios de inclusión, quedaron 31 publicaciones, de las cuales 9 emplearon la STG y 22 la SSG. La exclusión de los 26 artículos restantes se procedió con base en el tipo de población estudiada y métodos de estudio (n = 22), revisión narrativa (n = 3) e idioma chino (n = 1) (material suplementario 2).

Secuenciación de tercera generación

Los estudios que utilizaron la STG se realizaron en Japón (n = 2), Estados Unidos (n = 2), China (n = 2), Países Bajos (n = 1), Bélgica (n = 1) e India (n = 1). El número total de participantes fue de 153, de los cuales 40 fueron pacientes y 113 fueron controles sanos. En 3 estudios no se describió el sexo de los participantes (n = 22), y el sexo predominante de los participantes fue el femenino (52,9%). En 2 estudios se describió la edad de los pacientes (6 años). Los tipos de variantes genéticas que se analizaron fueron variantes estructurales (ej. translocaciones, CNV), SNV, disomías uniparentales y repetición de trinucleótidos. En 5 pacientes se pudo realizar la búsqueda simultánea de estas variantes y en la mayoría solo se buscó variantes estructurales (n = 29). La comprobación de la existencia de estas variantes fue realizada mediante diferentes técnicas como análisis cromosómico por micromatrices, secuenciación Sanger, expresión de ARN, *Southern blotting*, *junction PCR*, *breakpoint mapping*, RT-QPCR, análisis de metilación (tabla 1).

A 6 pacientes que tenían estudios citogenéticos previos que mostraban translocaciones balanceadas, se les realizó adicionalmente CMA o SSG, no encontrándose la etiología de la discapacidad intelectual²²⁻²⁵. Mediante el uso de la STG, se pudo encontrar variantes estructurales como deleciones o inversiones a nivel intragénico²²⁻²⁵. En un paciente, mediante la STG, se demostró una trisomía parcial del cromosoma 11 y 22 (síndrome Emanuel)²⁶.

En el caso de 2 gemelas con DI y dismorfia, se hicieron WES-trío y al no encontrar variantes, se les realizó STG-trío en busca de SNV, variantes estructurales o inserciones/deleciones (*indels*), encontrando una VE ocasionada por una inversión en el gen BRPF1, el cual fue heredado de una inversión neutral materna²⁷.

En 6 pacientes con DI, cuyo pedigrí sugería una herencia ligada al cromosoma X, se empleó CMA y exoma del cromosoma X, no encontrándose CNV ni repeticiones en tándem (RET). Luego de la STG se encontró una RET en el cromosoma X en uno de los pacientes que está relacionada con la expresión de *MIR222*, el cual a su vez está relacionado en la expresión del gen *FMR1*, por lo que probablemente esta variante estaría relacionado con el fenotipo descrito²⁰.

En 15 pacientes (casos [n = 05] y controles familiares [n = 10]) con estudios previos de CMA, WES, metiloma sin resultados de variantes, se comparó la STG y la WGS en búsqueda de variantes estructurales. Ningún paciente presentó una variante relacionada con el fenotipo; no obstante, la STG encontró 5 veces más variantes estructurales que la SSG¹⁹.

Finalmente, en un paciente que tenía el diagnóstico de síndrome Prader-Willi con análisis de metilación positiva, la STG pudo determinar la presencia de una heterodisomía uniparental en la posición 15q11.2²⁶.

Secuenciación de segunda generación

Con relación a los estudios que utilizaron la SSG (n = 22), uno era un metaanálisis y el resto eran observacionales. Las investigaciones se realizaron en mayor frecuencia en China (n = 3), Corea (n = 3), Canadá (n = 2), Japón (n = 2), Irán (n = 2), Francia (n = 2) y EE. UU. (n = 2). Las poblaciones estudiadas fueron heterogéneas (n = 5.516), con diagnósticos que no tenían necesariamente el fenotipo de DI. El número total de participantes con DI fue de 4.029, con edades fluctuantes entre pediátricas y adultos. Los tipos de pruebas que emplearon fueron desde la secuenciación de paneles que incluía un número de 47 genes hasta secuenciación de genoma-trío. En 6 estudios no se precisó el sexo de los participantes. Del total de los reportes que describieron el sexo, el 56,95% de los participantes fueron varones. La mayoría de los estudios determinaron SNV, excepto uno que utilizó la SSG como método para determinar la expresión de ARN. Adicionalmente, 7 estudios buscaron CNV (tabla 2)²⁸⁻⁴⁹.

La frecuencia de las variantes en un único nucleótido es muy variable y se encuentra entre el 10,2 y el 65,8% de los pacientes con DI^{28-44,46-48}.

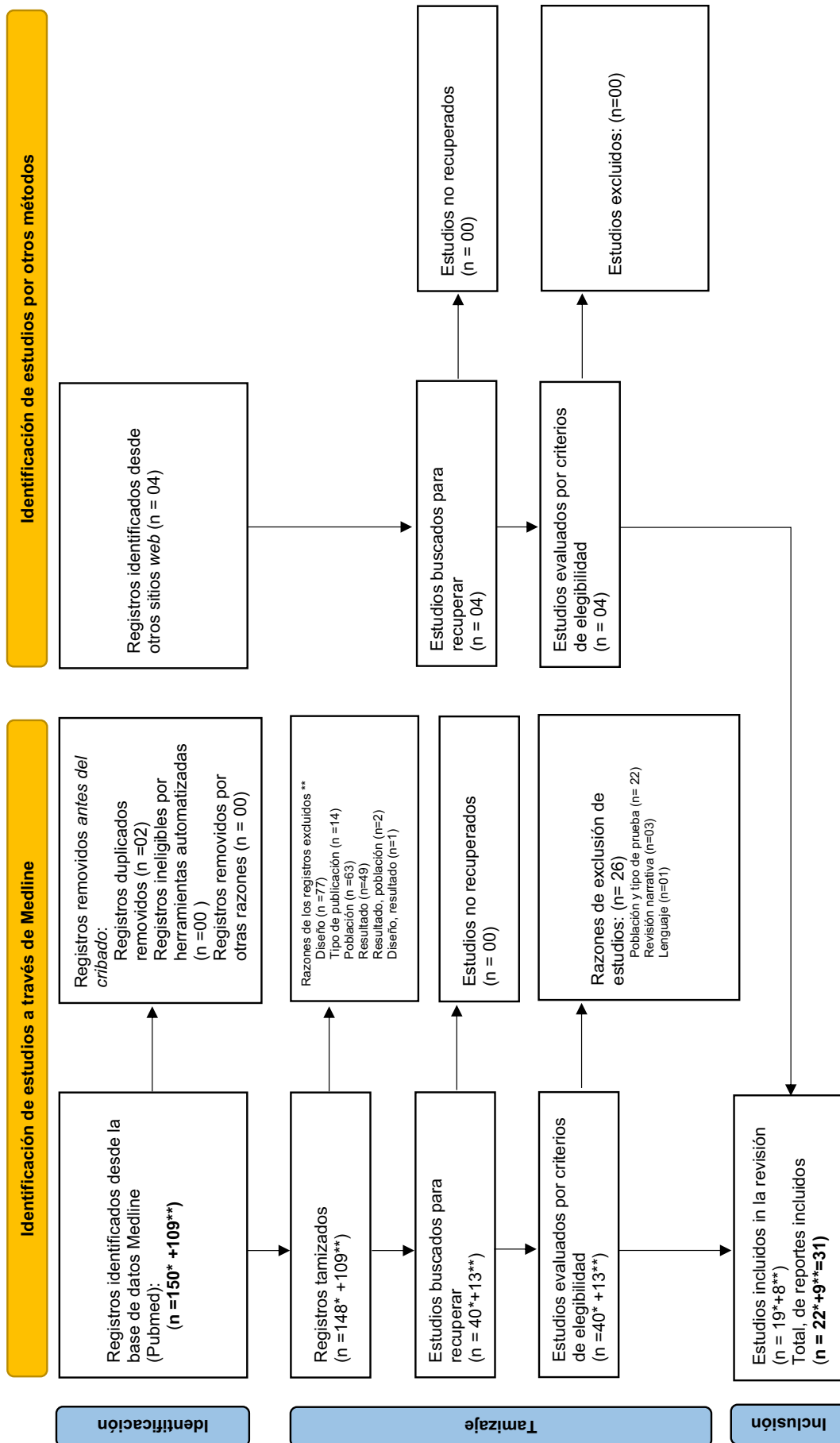


Figura 1. Selección de artículos científicos basado en PRISMA. *Secuenciación de segunda generación. ** Secuenciación de tercera generación. Extraído de: Page et al.[69].

Tabla 1
Características de los estudios en pacientes con discapacidad intelectual utilizado la secuenciación de tercera generación

Autor	Población	Controles	Edad	Sexo	Estudios previos	Variante desenlace	Estudio de comparación	Resultado	Tipo de STG
Zablotskaya A et al. ²⁰	6	100	ND	Masculino	Exoma y CMA del X negativo.	Repeticiones en el cromosoma X	-	STG detectó repeticiones en tándem, las que no fueron encontradas con las de SSG. En un paciente esa repetición tenía relación con MIR222, el cual modifica la expresión de FMR1	PacBio RS, se determinó previamente que las familias tenían una transmisión ligada al cromosoma X, mediante STR (LOD de 2.406, 2.23 y 0.932)
Dutta UR et al. ²²	1	-	ND	Femenino	Citogenética 46,X,t(X;20)(q12;p13), microarray, FISH, determinación de inactivación del cromosoma X	Variantes estructurales	-	Disrupción gen ARHGEF9	Nanopore sequencing (MimION Mk1b) Spot ON flow
Leir et al. ²³	1	-	6	Masculino	Cariotipo con t(8;18)(q22;q21)	Variantes estructurales	WGS, CMA. Posteriormente se demostró con DNA arrange, Sanger (verificar sitios de ruptura), expresión génica (PCR real time)	Se encontró una delección en RAD21 Y EXT1	PromethION (nanopore)
Pauper et al. ¹⁹	5	10	ND	Femenino	Secuenciación de exoma/genoma, CMA, metiloma previo negativo	Variantes estructurales	WGS-trío	STG detecta 5 veces más VE que SSG	Pacific Biosciences Sequel I System 15-40x
Wang Y et al. ²⁴	3	-	6	Femenino (n = 2) Masculino (n = 1)	Previo WES y CMA negativo, cariotipo t(2;11)(p23;q23)	Variantes estructurales	-	Mostró 3 puntos de ruptura en la translocación e inversión en el gen ASXL2, demostrado por una disminución de expresión de este	Long-read sequencing nanopore
Mizuguchi T et al. ²⁷	2	3	ND	Femenino	WES	Variantes estructurales, SNV, Indels	WES trío	Detectó inversión de 12 kb en BRPFI. Madre con inversión neutral	HiFi LR-GS (1 paciente y 2 controles) (PacBio sequel II)
Chander V et al. ⁶³	19	-	ND	ND	-	Variantes estructurales	-	Delecciones grandes que incluía el gen ADH1C1	Oxford Nanopore
Yamada M et al. ²⁵	1	-	ND	ND	Cariotipo t(4;18)(q31;q11.2), delección 7 MB HOXD13	Variantes estructurales	-	Delección locus TLL1 que incluye a gen RAPGEF4, HOXD12	Oxford Nanopore
Sanford Kobayashi E et al. ²⁶	2	-	ND	ND	Cariotipo der(22)t(11;22), DUP 15q	Variantes estructurales, DUP	SSG, análisis de metilación	Detectó el doble de SNV que SSG	Pacbio sequel II
Total	33	13		Masculino (n = 8) Femenino (n = 9) ND (n = 22)		VE = 08; Repeticiones en el cromosoma X = 01; DUP = 01	n = 03		

CMA = Análisis cromosómico por micromatrices; DUP = Disomías uniparentales = 01; FISH = Hibridación in situ con fluorescencia; MB = megabases; STG = Secuenciación de tercera generación; SSG = Secuenciación de segunda generación; WES = Secuenciación de exoma completo; WGS = Secuenciación de genoma.

Tabla 2
Características de los estudios en pacientes con discapacidad intelectual utilizado la secuenciación de segunda generación (2017–2022)

Autor	Países	Población ^b	Población con DI	Edad	Sexo	Variable desentlace	Resultado	CNV%	SNV %	Tipo de SSG
Monies D et al. ²⁸	Arabia Saudita	167	167	-	-	SNV	48 (n = 167)		28,7	WES y paneles
Bowling KM et al. ²⁹	EE. UU.	997	342	6 - > 40 años	Masculino = 197 Femenino = 145	CNV, SNV	28,7% (n = 98) SNV 2,04% (n = 7)	2,04	28,7	WES o WEG
Cherot E et al. ³¹	Francia	216	155	5–56 años	Masculino = 82 Femenino = 73	SNV	32% (n = 50) SNV, NSID (10/33) SID (40/122)	-	32	Panel de 4.813 genes
Montagne L et al. ³⁰	Francia	145	82	-	-	CNV, SNV	CMA 54%, WES (16/82) 63%; y CodeSeq 100% de ambas variantes	15,9	19,5	Secuenciación de exoma total, mediante CoDE-seq
Matthews AM et al. ³⁶	Canadá	49	46	Menores a 19 (n = 42) y mayores a 19 (n = 7)	Masculino = 30 Femenino = 19	SNV	65% se encontró SNVs e indels		69,6	No se define el tipo de NGS
Yan H et al. ³⁵	China	112	49	4 m-17 años	Masculino = 69 Femenino = 43	SNV	11 pacientes (9,82%) con 14 variantes, 5 pacientes con DI. Variantes de novo en 8/11	6,8	9,82	Panel de 454 genes
Yamamoto T et al. ³⁷	Japón	133	133	-	Masculino = 81 Femenino = 52	SNV, CNV	29,3%; 30 con SNV y 9 CNV		22,6	Secuenciación de exoma clínico (TruSight one), si no se encuentra variantes se pasa a secuenciación trío
Han JY et al. ³⁸	Corea	75	75	-	Masculino = 51 Femenino = 24	SNV	8 variantes patogénicas con secuenciación		10,7	Secuenciación de 4.813 genes
Hu H et al. ^{33*}	Alemania (pacientes de Irán)	404	404	-	-	SNV	18% variantes en cromosoma X en DI consanguíneos iraníes, 5 genes (PP, ITGAV, RNFT2, and TTC5, PIDD1) nuevos descritos asociados a DI. 215 genes probables 27% de individuos		65,8	WES y WEG (secuenciación de zonas target-TGS-)
Aspromonte MC et al. ³⁴	Italia	150	150	2–42 años	Femenino = 59 Masculino = 91	SNV			27	Panel de ASD y/o DI (972 genes)
Munnich A et al. ³⁹	Francia	502	502	Menor a 10 años y mayores a 30 años	Masculino = 351 Femenino = 151	SNV	1,3% FMR1 + (n = 312); 8% CNV (n = 388); 23,4% SNV (n = 141)		28,1	Secuenciación de 439 genes, FMR1, CMA en tándem
Liao LH et al. ⁴⁰	China	1.051	455	6 meses- 18 años	Masculino = 685 Femenino = 366	SNV	593 con pruebas genéticas, 87 se encontró variantes relacionadas		22,6	Estudios genéticos en tándem: cariotipo-->CMA--> estudios metabólicos--> panel de 118/308, 3.994/4.678, mitocondrial y WES
Kim SH et al. ³²	Corea***	108	108	4 años RCI = 1,9–6,6 casos con variantes; 4,6 RCI = 2,6–7,6 casos sin variantes	Masculino = 69 Femenino = 39	CNV, SNV	41,7% (n = 45) con SNV (n = 33) y CNV (n = 12)	11,1	30,6	Panel de 4.503 genes
Lee S. ⁴³	Corea	81	58	0,1–14,9 años	Femenino = 45 Masculino = 35	SNV	23,5% (19)		24,1	Panel para 96 genes
Dong X et al. ⁴¹	China	1090	1090	1- mayores de 12 años	Femenino = 661 Masculino = 430	SNV, CNV	41,38% CNV + SNV; 12,02% (139) CNV/m; 397 SNV	12,02	28,6	Secuenciación de exoma clínico
Ibarluzea N et al. ⁴²	España	61	61	0-a mayores a 20 años	Masculino = 47 Femenino = 14	SNV	16/61, 7 VUS/61 con segregación		26,2	Targeted sequencing (82 genes), análisis de segregación y expresión de RNA
Suga K et al. ⁴⁴	Japón	18	9	-	-	SNV, CNV's	44% de pacientes en UCI neonatal	22,2	11,1	Secuenciación de exoma de 4.813 y Targeted panel sequencing
Trakadis Y et al. ⁴⁶	Canadá	34	34	Mayores a 16	Masculino = 22 Femenino = 12	SNV, CNV	11 (32%) SNV y 3 CNV; 13 VUS en 12 pacientes. Resultados positivos tenían en trastornos psiquiátricos, convulsiones y DI con p 0,024, 0,024 y 0,054 respectivamente	8,8	32,3	Panel DX (2.500 genes targeted ID/TEA)
Nouri N et al. ⁴⁷	Irán	61	61	38 días/15 años	Masculino = 40 Femenino = 21	SNV	59% (36) SNV; 6,5% (4) VUS, 28 genes. Microcefalia es el fenotipo es más frecuente. Epilepsia en 40%		59	WES

EE. UU.	Metanálisis	-	-	SNV	Dia = 28,2% (22%-35%), TEA + DI 24,6 (18-32); E + DI 27,9(24-33), West 19,3(14-26); DEE 38,8(23-57) 20% (n = 35) encontraron SNVs	28,2-38,8	Panel de 47 genes (15 epilepsia + 7 TEA + 25 EED)
Duzkale N et al. ⁴⁸	35	21	-	SNV	Se expresaron 1800 miARN, quedando 25 y luego se filtro solo a 9	20	Panel de 464 relacionados a epilepsia
Soroudeh Anvari M et al. ⁴⁹	27	27	25-36 M/48-80F	Cuantificación de miARN	Masculino = 9 Femenino = 6	-	Secuenciación de miARN/Cuantificación de miARN por transcripción reversa
TOTAL	3.068	2.426	-		Masculino = 2.289 Femenino = 1.730	2.04-22.2	9,82-65,8

CMA = Análisis cromosómico por micromatrices; CNV = Variantes en el número de copias; DI = Discapacidad intelectual; FISH = Hibridación in situ con fluorescencia; Indels = Inserciones/delecciones; NSID = Discapacidad intelectual no síndromica; MB = megabases; SID = Discapacidad intelectual síndromica; STG = Secuenciación de tercera generación; SSG = Secuenciación de segunda generación; SNV = Variantes de un solo nucleótido; WGS = Secuenciación de genoma; WES = Secuenciación de exoma completo. ^a Se estudiaron a 404 familias con más de dos afectados. ^b Población total. ^cNo se especifica el diagnóstico de los pacientes si presentaron retraso del desarrollo psicomotor o discapacidad intelectual.

En un metaanálisis previo se encontró que la SSG detecta SNV en el 28,2% (IC 95%, 22-35%) de los pacientes con DI aislada; en el 24,6% (18-32%) con trastorno del espectro autista y DI; en el 27,9% (24-33%) con epilepsia y DI; en el 19,3% (14-26%) de pacientes con síndrome West y 38,8% (23-57%) de pacientes con encefalopatía epiléptica y del desarrollo⁴⁵.

Al realizar el metaanálisis en el presente estudio, con relación a la detección de SNV mediante la SSG del presente estudio, encontramos que la frecuencia es de 29,8% (IC 95%; 22,2-37,4%, I² = 95,8%) (fig. 2A).

Por otro lado, 7 investigaciones determinaron CNV mediante la SSG y encontraron variantes entre 2,02 y 22,2% de los pacientes con DI^{29,30,32,37,41,44,46}. Al proceder con el metaanálisis en el presente estudio, se encontró que la SSG puede detectar CNV en el 9,15% (IC 95%; 5,1-13,2%; I² = 86,2%) (fig. 2B).

Adicionalmente, un estudio que utilizó SSG cuantificó la expresión de miARN en pacientes con el síndrome del X frágil, el cual detectó en 9 de ellos que puede servir no solo como diagnóstico, sino como biomarcador⁴⁹.

Riesgo de sesgo y calidad de la evidencia

La calidad de los estudios que usaron STG se midió mediante la escala de Murad encontrando que todas las publicaciones tenían un riesgo de sesgo bajo (tabla 3). Con relación a los estudios de SSG la calidad se verificó mediante los criterios de Newcastle-Ottawa que fueron modificados para el presente estudio, donde el puntaje máximo fue de 10, observando que uno obtuvo un puntaje de 7, y el resto obtuvo un puntaje mayor o igual a 8 (tabla 4).

Discusión

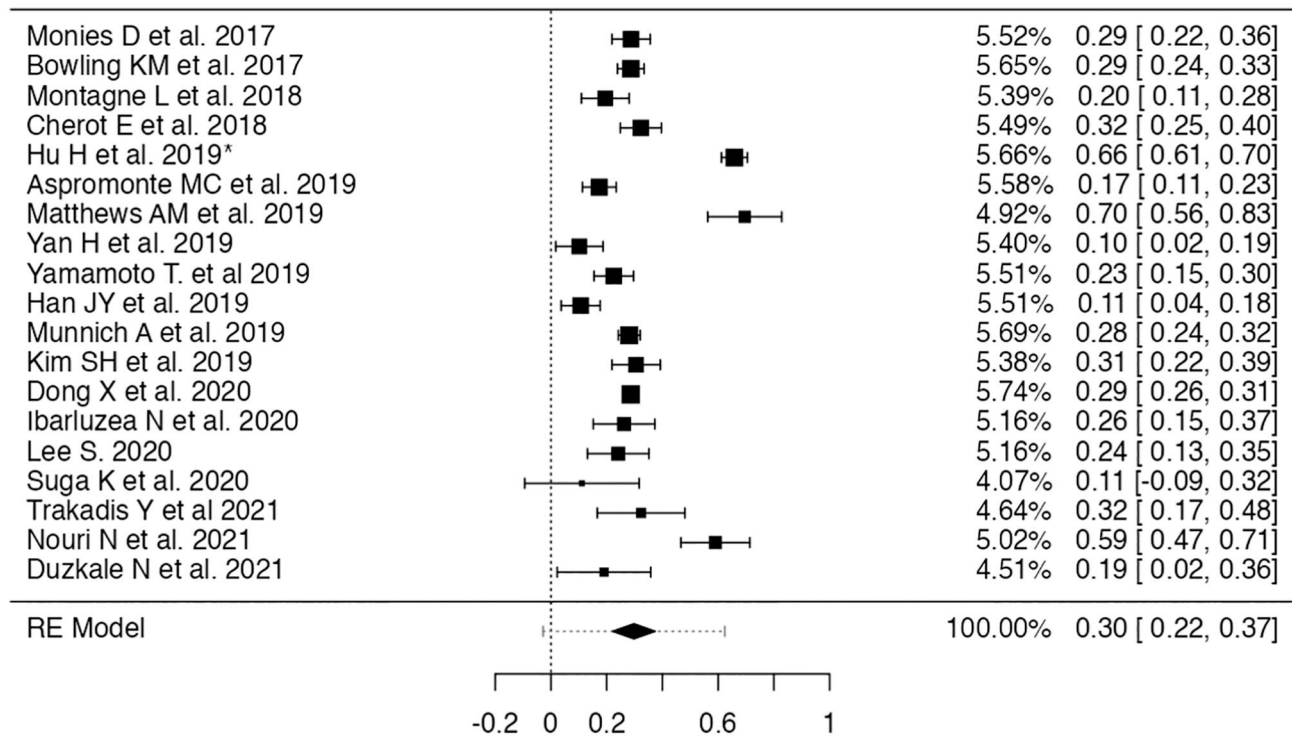
La SSG, que va desde los análisis de paneles hasta la secuenciación de genoma completo, se ha convertido en los últimos años en una herramienta más accesible, lo cual ha revolucionado el diagnóstico etiológico⁵⁰.

Sin embargo, la frecuencia de detección de las variantes en las enfermedades genéticas, en general, ha permanecido casi constante^{51,52}. Esto puede deberse a varios factores, como que la enfermedad evaluada no tenga un origen genético, que la variante genética hallada no pueda ser interpretada debido a la falta de información o que la causa molecular de la enfermedad no pueda ser detectada por la técnica utilizada²⁶.

Es así que existe un grupo de pacientes con DI cuyos resultados de WES, WGS o CMA son negativos, a pesar de tener por ejemplo datos clínicos y un tipo de herencia determinado que se puede determinar por el número o el sexo de pacientes afectados, el número de generaciones comprometidas o el antecedente de consanguinidad, lo cual induce a plantear que la etiología de la discapacidad intelectual sería por la presencia de una variante genética. En ese sentido, en la actualidad existen herramientas que podrían ayudar en encontrar la etiología, mediante, por ejemplo, el uso de la secuenciación de ARN. Sin embargo, la disponibilidad del tejido afectado (ej. biopsia cerebral) la hace poco factible²⁶.

La longitud de los reads se refiere al número de pares de bases (pb) secuenciados en un fragmento de ADN. Cuando se utiliza la SSG, estos fragmentos son cortos. Luego de la secuenciación, las regiones que se superponen son utilizadas para ensamblar los reads y alinearlos a un ADN de referencia, reconstruyendo así la cadena de ADN. Por ejemplo, la data obtenida con una plataforma Illumina® posee reads de 150 pb y puede alinearse con éxito aproximadamente el 84% del genoma humano⁵³. Sin embargo, existen regiones repetidas que son fragmentos de 150 pb, los cuales corren el riesgo de mapearse a múltiples posiciones, y por lo tanto, son normalmente excluidas del análisis⁵⁴. Estos territorios genómicos son llamados como «regiones muertas» para la SSG, incluyendo a las zonas repetidas (*short tandem repeats* o STR, regiones alfoides que componen los centrómeros), zonas de baja

A



Random-Effects Model (k = 19)		Frecuencias relativas				
	Estimate	se	Z	p	CI Lower Bound	CI Upper Bound
Intercept	0.298	0.0389	7.66	<.001	0.222	0.374

Nota. Tau² Estimator: Restricted Maximum-Likelihood

[3]

Heterogeneity Statistics

Tau	Tau ²	I ²	H ²	R ²	df	Q	p
0.162	0.0261 (SE= 0.0095)	95.87%	24.234	.	18.000	371.751	<.001

Figura 2. Estudios de secuenciación de segunda generación que determinan las variantes en un solo nucleótido en pacientes con discapacidad intelectual (2017–2022). B. Reportes de secuenciación de segunda generación que determinan variantes en el número de copias en pacientes con discapacidad intelectual (2017–2022).

complejidad (ej. elementos ALU), o regiones duplicadas (ej. pseudogenes). Además, la secuenciación de Illumina® es insensible a variaciones estructurales mayores a 50 pb, donde se estima que el 75% de los eventos, en su mayoría inserciones, son obviados⁵⁵. Es evidente entonces que la SSG posee limitaciones intrínsecas debido a su propio desarrollo tecnológico.

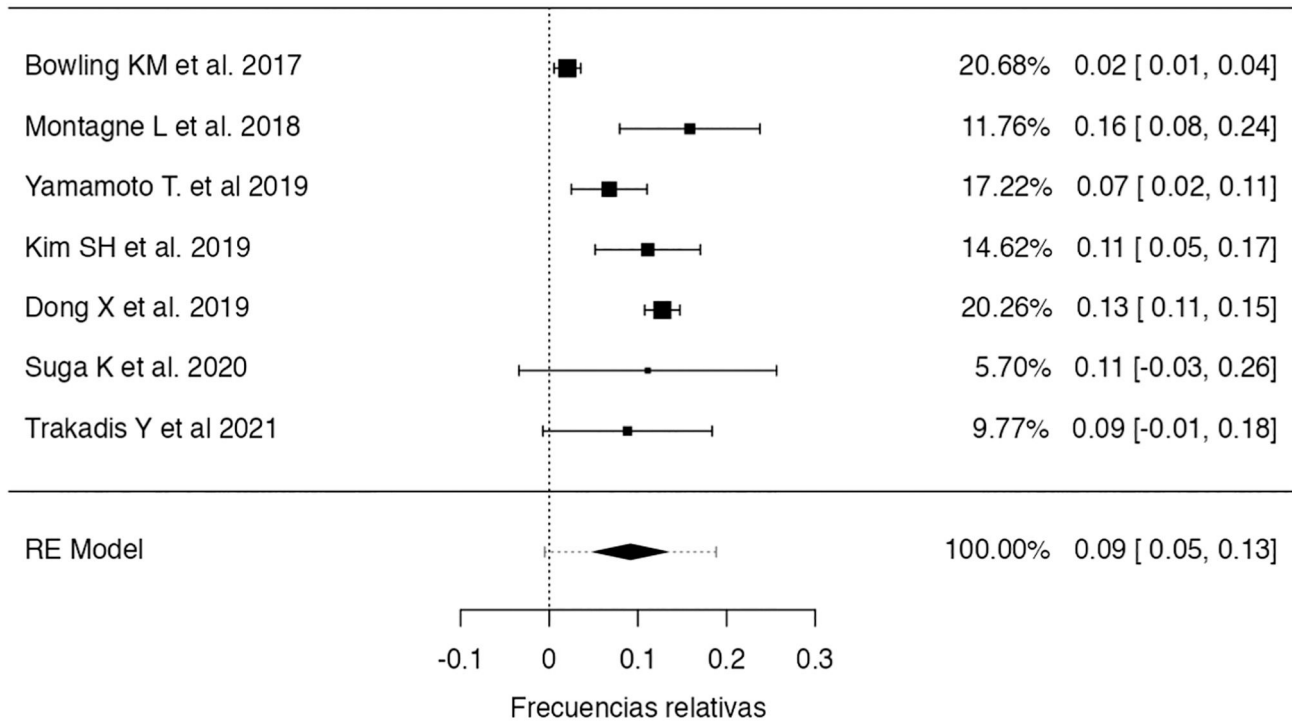
Por otro lado, se tiene que la STG (también conocida como *Long-Read Sequencing* o LRS), que está basada en que los reads sean fragmentos largos de hasta más de 100 veces en comparación a la SSG (mayor a 10 Kpb hasta por encima de 1 Mb)⁵⁶.

Es así que la STG está mostrando su potencialidad para detectar un mayor número de variantes con relación a la de segunda generación. En ese sentido, la STG tiene una alta fidelidad para las pequeñas variantes y puede identificar casi todas las variantes halladas por la

SSG. Así mismo, tiene la habilidad de establecer la presencia de variantes estructurales, particularmente aquellas mediadas por elementos repetitivos o de baja complejidad (ej. elementos ALU). Además, detecta defectos en la metilación genómica, y por ende puede servir como una herramienta diagnóstica y funcional. Y por último es su capacidad de detectar eficientemente variantes en las «zonas muertas», lo cual se puede realizar con SSG solo si se aplican complejos métodos bioinformáticos, extensas bases de datos para eliminar falsos positivos y numerosos métodos ortogonales para confirmar las variantes²⁶.

En la presente revisión rápida, se observó que en la cohorte de pacientes con DI que empleó la STG, todos tenían previamente o durante las evaluaciones análisis genómicos que no contribuían para el diagnóstico. La mayoría de los estudios en el que se utilizó la STG encontraron el cambio genético relacionado a la DI, siendo el más

B



Random-Effects Model (k = 7)

	Estimate	se	Z	p	CI Lower Bound	CI Upper Bound
Intercept	0.0915	0.0207	4.43	<.001	0.051	0.132

Nota. Tau² Estimator: Restricted Maximum-Likelihood

[3]

Heterogeneity Statistics

Tau	Tau ²	I ²	H ²	R ²	df	Q	p
0.045	0.002 (SE= 0.0017)	86.22%	7.254	.	6.000	80.451	<.001

Figura 2 (continued).

frecuente las variantes estructurales (40%)²²⁻²⁶. En este aspecto, se ha observado que el número de variantes estructurales encontradas en los pacientes es más frecuente cuando se usa la STG, que la SSG[19]. Y en aquellos con alteraciones cromosómicas estructurales aparentemente balanceadas, se detectó las variantes estructurales submicroscópicas en los sitios de ruptura y unión²²⁻²⁵. En este sentido, es muy probable que muchas de las variantes estructurales sean submicroscópicas (ej. inserciones, inversiones, translocaciones), las cuales no podrán ser detectadas mediante las pruebas de rutina disponible a la fecha⁵⁷. En este grupo de enfermedades es donde justo tomaría protagonismo la STG, tal como se demostró en el paciente con una inversión patogénica en el gen BRPF1²⁷.

El síndrome del X frágil se observa en el 2,4% de las personas con DI y se considera la segunda causa relativa más frecuente después del

síndrome de Down. Este síndrome es causado por una expansión de tripletes y esta condición se detecta mediante pruebas específicas y no son descubiertas por las pruebas genómicas como CMA o WGS^{58,59}. La STG, adicionalmente, es capaz de detectar el número de repeticiones de los trinucleótidos CGG del gen FMR1 en portadores, incluido el de poder detectar el número de repeticiones AGG dentro del tándem de CGG, lo cual conferiría una ventaja adicional al estudio tradicional, que sería el de ofrecer no solo la posibilidad de diagnóstico, sino la estratificación del fenotipo⁶⁰⁻⁶³. En este sentido, tendría la capacidad de detectar segmentos en el genoma que presenten RET, las cuales podrían estar relacionadas a DI²⁰.

Otra fortaleza del uso de la STG es el poder localizar variantes cromosómicas (ej. CNV o rreareglos complejos)²⁶ o disomías uniparentales²⁶ y lógicamente una mayor capacidad de encontrar SNV¹⁹.

Tabla 3

Análisis de riesgo de sesgo de los estudios realizados en pacientes con discapacidad intelectual utilizando la secuenciación de tercera generación mediante la escala de Murad modificada

Autor	Selección de individuos	Comprobación		Causalidad		Informe Detalle	Total (Máximo 6 pts)
		Exposición	Resultado	Otras causas	Fenómeno de desafío		
Pauper et al. ¹⁹	1	1	1	1	1	1	6
Lei M et al. ²³	1	1	1	1	1	1	6
Wang Y et al. ²⁴	1	1	1	1	1	1	6
Zablotskaya A et al. ²⁰	1	1	1	1	1	1	6
Mizuguchi T et al. ²⁷	1	1	1	1	1	1	6
Dutta UR et al. ²²	1	1	1	1	1	1	6
Chander V et al. ⁶⁵	1	1	1	1	1	1	6
Yamada M et al. ²⁵	1	1	1	1	1	1	6
Sanford Kobayashi E et al. ²⁶	1	1	1	1	1	1	6

Las limitaciones que tienen las investigaciones que utilizaron la STG es que ninguno calculó la exactitud diagnóstica, utilizando por ejemplo sensibilidad, especificidad o los valores predictivos; lo cual se debió principalmente al diseño y al número pequeño de participantes en cada estudio. Por otro lado, la STG no se empleó como primera prueba de elección, lo cual no permitió una comparación con la SSG ni mostrar las ventajas que son principalmente el de determinar otras variantes en «sitios muertos»⁶⁴. Sin embargo, en todos los estudios de los pacientes con DI que se realizaron la STG comprobó la existencia de las variantes encontradas con otras técnicas *gold standard*, destacando así la buena calidad y el bajo riesgo de sesgo en todos los reportes^{19,20,22-27,65}.

Con relación al metaanálisis del uso de SSG en pacientes con DI, las proporciones de SNV que se encontraron fueron similares a un estudio previo (29,2% vs. 28,6%)⁴⁵. Una limitación de los estudios es que los criterios de selección no fueron similares y no se encontró una clasificación de la DI de forma uniforme según severidad o de diagnósticos asociados. Además, las pruebas de SSG utilizadas van desde el análisis de exones de algunas decenas hasta miles de genes, o la inclusión de las regiones intrónicas (secuenciación de genoma), lo cual muestra la gran heterogeneidad de los estudios.

Se observó también que la SSG mostró una capacidad de detectar CNV, por lo que según este trabajo, muestra que esta tecnología

alcanzaría a establecer la etiología en el 9,2% de los pacientes con DI. No obstante, aún no conseguiría la frecuencia de detección que tiene el análisis cromosómico por micromatrices que está $\approx 30\%$ ⁶⁶.

Se tiene que precisar que dependiendo del tipo de tecnología de secuenciación, donde los productos de estos segmentos secuenciados son cortos o largos, estos deberán ser comparados con genomas de referencia distintos. El genoma de referencia actual, GRCh38, está incompleto, ya que no contiene regiones heterocromáticas como los centrómeros y algunos segmentos idénticos duplicados (seudogenes). Con la tecnología SSG, esto no era un problema, pero con la STG se corre el riesgo de secuenciar fragmentos y no tener una referencia a la cual alinearlos⁶⁷. Existe un nuevo genoma de referencia, T2T-CHM13, que contiene más de 240 Mbp de secuencia adicional, incluyendo todos los centrómeros, duplicaciones segmentales y los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos⁶⁷. Este nuevo ensamble ya ha sido utilizado en estudios que confirman su utilidad en conjunto con tecnologías de STG⁶⁸.

A pesar de que la STG tiene una mejor posibilidad de encontrar todas las variantes genéticas sobre la SSG y sus riesgos de sesgo y calidad de las diferentes publicaciones son adecuados, no son equiparables ya que los reportes que utilizaron la STG y SSG son estudios de casos y transversales, respectivamente.

Tabla 4

Calidad de los estudios realizados en pacientes con discapacidad intelectual utilizando la secuenciación de segunda generación (2017–2022), con criterios modificados de Newcastle-Ottawa

Autor	Selección de muestra			Comparabilidad (3 puntos)		Resultados			Total
	Representatividad (1 punto)	Tamaño de la muestra mayor a 30 (1 punto)	Diagnóstico de DI con escalas (2 puntos), solo menciona (1 punto)	Control del factor más importante (secuenciación) -2 puntos-	Control para otro factor adicional (otros estudios genómicos/genéticos o confirmación de variantes)	Resultado de variantes patogénicas	Utilizaron bases de datos confiables	Estadística (incluye al menos porcentaje)	
Suga K et al. ⁴⁴	1	0	1	2	0	1	1	1	7
Dong X et al. ⁴¹	1	1	1	2	0	1	1	1	8
Trakadis Y et al. ⁴⁶	1	0	2	2	0	1	1	1	8
Nouri N et al. ⁴⁷	1	1	1	2	0	1	1	1	8
Lee S. ⁴³	1	1	1	2	0	1	1	1	8
Duzkale N et al. ⁴⁸	1	1	1	2	0	1	1	1	8
Sotoudeh Anvari M et al. ⁴⁹	1	0	1	2	1	1	1	1	8
Kim SH et al. ³²	1	1	0	2	1	1	1	1	8
Hu H et al. ^{33*}	1	1	1	2	1	1	1	1	9
Monies D et al. ²⁸	1	1	1	2	1	1	1	1	9
Matthews AM et al. ³⁶	1	1	2	2	0	1	1	1	9
Yan H et al. ³⁵	1	1	2	2	0	1	1	1	9
Montagne L et al. ³⁰	1	1	1	2	1	1	1	1	9
Munnich et al. ³⁹	1	1	1	2	1	1	1	1	9
Cherot E et al. ³¹	1	1	1	2	1	1	1	1	9
Aspromonte MC et al. ³⁴	1	1	2	2	1	1	1	1	10
Ibarluzea N et al. ⁴²	1	1	2	2	1	1	1	1	10
Yamamoto T et al. ³⁷	1	1	2	2	1	1	1	1	10
Han JY et al. ³⁸	1	1	2	2	1	1	1	1	10
Liao LH et al. ⁴⁰	1	1	2	2	1	1	1	1	10
Bowling KM et al. ²⁹	1	1	2	2	1	1	1	1	10

Una limitación inherente al presente estudio es que al momento de realizar la búsqueda de manera sistemática, hemos encontrado que el descriptor relacionado a la STG no se encuentra en MESH ni DECS, y por otro lado la única base de datos fue la de Medline.

Considerando todo lo expuesto, estamos de acuerdo con los autores de un estudio previo, quienes concluyeron que la STG puede ser un examen de primera línea en laboratorios que no tienen una alta capacidad de aplicación de herramientas bioinformáticas o equipos de laboratorio²⁶. Esto, basado adicionalmente, en que la calidad de todos los estudios es alta cuando se usó la STG. En el mismo sentido, no estaría contraindicado el uso de SSG en pacientes con DI, ya que observamos que la calidad de los estudios en su mayoría fue alta y debería seguir siendo la primera prueba de elección en este grupo de pacientes. Y el uso de CMA para la detección de CNV debiera aún ser la prueba complementaria, en aquellos pacientes con DI que tuvieron la secuenciación negativa.

Además, debido a las ventajas que posee la STG, las cuales fueron previamente descritas, se reduciría la cantidad potencial de exámenes adicionales necesarios para llegar al diagnóstico definitivo del paciente, si fuese un diagnóstico molecular, ahorrando tiempo y esfuerzo de parte del laboratorio, las plataformas y los médicos.

Son interesantes las ventajas que se describen para la tecnología STG frente a la SSG en el diagnóstico de la DI. Sin embargo, el hallazgo de un número mayor de variantes, si bien abre muchas puertas a la investigación, no tiene la misma repercusión en la clínica debido a la poca información que existe hasta la fecha acerca de la relación de causalidad entre cada variante y su potencial cuadro clínico. Es decir, se necesitan aún más estudios para saber el verdadero impacto que tendría la tecnología de STG en el diagnóstico de la DI y cuál es la relevancia clínica de estas nuevas variantes.

Financiación

Ninguna.

Autoría

Hugo Abarca participó en todas las fases de la investigación. Flor Vásquez participó en la introducción, interpretación de los resultados, discusión y la aprobación final del manuscrito. Este artículo es original.

Agradecimientos

A las Doctoras Yamilee Hurtado y Marta Martina, por su enorme apoyo como guía en el diseño y en la redacción del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.psiq.2023.100392>.

Bibliografía

- Boat TF, Wu JT, Disorders C to E the SSIDP for C with M, Populations B on the H of S, Board on Children Y, Medicine I of, et al. Clinical characteristics of intellectual disabilities [Internet]. *Mental Disorders and Disabilities Among Low-Income Children*. National Academies Press (US); 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK332877/> [consultado 31 Mar 2020].
- Brown KA, Parikh S, Patel DR. Understanding basic concepts of developmental diagnosis in children. *Transl Pediatr*. 2020;9(Suppl 1):S922.
- Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). *American Psychiatric Pub*; 2013. 1520 p.
- Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord*. 2010;2(4):182–209.
- Katz G, Lazcano-Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Publica Mex*. 2008;50:S132–41.
- Maulik PK, Darmstadt GL. Childhood disability in low- and middle-income countries: overview of screening, prevention, services, legislation, and epidemiology. *Pediatrics*. 2007;120(Supplement 1):S1–55 1 de julio de.
- Mercadante MT, Evans-Lacko S, Paula CS. Perspectives of intellectual disability in Latin American countries: epidemiology, policy, and services for children and adults. *Curr Opin Psychiatry*. 2009;22(5):S469–74.
- Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:161–87.
- Abarca Barriga HHA. Avances genómicos de la última década y su influencia en el enfoque diagnóstico de la discapacidad intelectual. *Rev de Neuro-Psiquiatría*. 2021;84(1):33–50.
- Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol*. 2016;56(4):394–404.
- Khouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of sequencing technologies: from first to next generation. *Biol Med (Aligarh) [Internet]*. 2017;09(03) Disponible en: <https://www.omicsonline.com/open-access/generations-of-sequencing-technologies-from-first-to-next-generation-0974-8369-1000395.php?aid=87862> [consultado 5 Nov 2022].
- van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The third revolution in sequencing technology. *Trends Genet*. 2018;34(9):666–81.
- Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med*. 2019;21(11):2413–21.
- Manickam K, McClain MR, Demmer LA, Biswas S, Kearney HM, Malinowski J, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2021;23(11):2029–37.
- Lindstrand A, Eisfeldt J, Pettersson M, Carvalho CMB, Kvarnung M, Grigeliuniene G, et al. From cytogenetics to cytogenomics: whole-genome sequencing as a first-line test comprehensively captures the diverse spectrum of disease-causing genetic variation underlying intellectual disability. *Genome Med [Internet]*. 2019;11:11 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6836550/> [consultado 12 Jun 2020].
- Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344–7.
- Wang J, Wang Y, Wang L, Chen WY, Sheng M. The diagnostic yield of intellectual disability: combined whole genome low-coverage sequencing and medical exome sequencing. *BMC Med Genet*. 2020;13:70.
- Abe-Hatano C, Iida A, Kosugi S, Momozawa Y, Terao C, Ishikawa K, et al. Whole genome sequencing of 45 Japanese patients with intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2021;185(5):1468–80.
- Pauper M, Kucuk E, Wenger AM, Chakraborty S, Baybayan P, Kwint M, et al. Long-read trio sequencing of individuals with unsolved intellectual disability. *Eur J Hum Genet*. 2021;29(4):637–48.
- Zablotskaya A, Van Esch H, Verstrepen KJ, Froyen G, Vermeesch JR. Mapping the landscape of tandem repeat variability by targeted long read single molecule sequencing in familial X-linked intellectual disability. *BMC Med Genet*. 2018;11:123.
- Murad MH, Sultan S, Haffar S, Bazerbachi F. Methodological quality and synthesis of case series and case reports. *BMJ Evid. Based Med*. 2018;23(2):60–3.
- Dutta UR, Rao SN, Pidugu VK, Vineeth SV, Bhattacharjee A, Bhowmik AD, et al. Breakpoint mapping of a novel de novo translocation t(X;20)(q11.1;p13) by positional cloning and long read sequencing. *Genomics*. 2019;111(5):1108–14.
- Lei M, Liang D, Yang Y, Mitsuhashi S, Katoh K, Miyake N, et al. Long-read DNA sequencing fully characterized chromothripsis in a patient with Langer-Giedion syndrome and Cornelia de Lange syndrome-4. *J Hum Genet*. 2020;65(8):667–74.
- Wang Y, Tan J, Wang Y, Liu A, Qiao F, Huang M, et al. Diagnosis of shashi-pena syndrome caused by chromosomal rearrangement using nanopore sequencing. *Neuro Genet*. 2021;7(6):e635.
- Yamada M, Suzuki H, Miya F, Takenouchi T, Kosaki K. Deciphering complex rearrangements at the breakpoint of an apparently balanced reciprocal translocation t(4;18)(q31;q11.2)dn and at a cryptic deletion: Further evidence of TLL1 as a causative gene for atrial septal defect. *Am J Med Genet A*. 2022;188(8):2472–8.
- Sanford Kobayashi E, Batalov S, Wenger AM, Lambert C, Dhillon H, Hall RJ, et al. Approaches to long-read sequencing in a clinical setting to improve diagnostic rate. *Sci Rep*. 2022;12(1):16945.
- Mizuguchi T, Okamoto N, Yanagihara K, Miyatake S, Uchiyama Y, Tsuchida N, et al. Pathogenic 12-kb copy-neutral inversion in syndromic intellectual disability identified by high-fidelity long-read sequencing. *Genomics*. 2021;113(1 Pt 2):1044–53.
- Monies D, Abouelhoda M, AlSayed M, Alhassan Z, Alotaibi M, Kayyali H, et al. The landscape of genetic diseases in Saudi Arabia based on the first 1000 diagnostic panels and exomes. *Hum Genet*. 2017;136(8):921–39.
- Bowling KM, Thompson ML, Amaral MD, Finnili CR, Hiatt SM, Engel KL, et al. Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome Med*. 2017;9(1):43.

30. Montagne L, Derhourhi M, Piton A, Toussaint B, Durand E, Vaillant E, et al. CoDE-seq, an augmented whole-exome sequencing, enables the accurate detection of CNVs and mutations in Mendelian obesity and intellectual disability. *Mol Metab.* 2018;13:1–9.
31. Chérot E, Keren B, Dubourg C, Carré W, Fradin M, Lavillaureix A, et al. Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: Experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clin Genet.* 2018;93(3):567–76.
32. Kim SH, Kim B, Lee JS, Kim HD, Choi JR, Lee ST, et al. Proband-only clinical exome sequencing for neurodevelopmental disabilities. *Pediatr Neurol.* 2019;99:47–54.
33. Hu H, Kahrizi K, Musante L, Fattahi Z, Herwig R, Hosseini M, et al. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. *Mol Psychiatry.* 2019;24(7):1027–39.
34. Aspromonte MC, Bellini M, Gasparini A, Carraro M, Bettella E, Polli R, et al. Characterization of intellectual disability and autism comorbidity through gene panel sequencing. *Hum Mutat.* 2019;40(9):1346–63.
35. Yan H, Shi Z, Wu Y, Xiao J, Gu Q, Yang Y, et al. Targeted next generation sequencing in 112 Chinese patients with intellectual disability/developmental delay: novel mutations and candidate gene. *BMC Med Genet.* 2019;20(1):80.
36. Matthews AM, Blydt-Hansen I, Al-Jabri B, Andersen J, Tarailo-Graovac M, Price M, et al. Atypical cerebral palsy: genomics analysis enables precision medicine. *Genet Med.* 2019;21(7):1621–8.
37. Yamamoto T, Imaizumi T, Yamamoto-Shimajima K, Lu Y, Yanagishita T, Shimada S, et al. Genomic backgrounds of Japanese patients with undiagnosed neurodevelopmental disorders. *Brain and Development.* 2019;41(9):776–82.
38. Han JY, Jang W, Park J, Kim M, Kim Y, Lee IG. Diagnostic approach with genetic tests for global developmental delay and/or intellectual disability: Single tertiary center experience. *Ann Hum Genet.* 2019;83(3):115–23.
39. Munnich A, Demily C, Frugère L, Duwime C, Malan V, Barcia G, et al. Impact of on-site clinical genetics consultations on diagnostic rate in children and young adults with autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2019;10:33.
40. Liao LH, Chen C, Peng J, Wu LW, He F, Yang LF, et al. Diagnosis of intellectual disability/global developmental delay via genetic analysis in a central region of China. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(13):1533–40.
41. Dong X, Liu B, Yang L, Wang H, Wu B, Liu R, et al. Clinical exome sequencing as the first-tier test for diagnosing developmental disorders covering both CNV and SNV: a Chinese cohort. *J Med Genet.* 2020;57(8):558–66.
42. Ibarluzea N, Hoz AB, de la Villate O, Llano I, Ocio I, Martí I, et al. Targeted next-generation sequencing in patients with suggestive X-linked intellectual disability. *Genes (Basel).* 2020;11(1):E51.
43. Lee J, Park JE, Lee C, Kim AR, Kim BJ, Park WY, et al. Genomic analysis of Korean patient with microcephaly. *Front Genet.* 2020;11, 543528.
44. Suga K, Imoto I, Ito H, Naruto T, Goji A, Osumi K, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of patients with congenital multiple anomalies and / or intellectual disabilities. *J Med Investig.* 2020;67(34):246–9.
45. Stefanski A, Calle-López Y, Leu C, Pérez-Palma E, Pestana-Knight E, Lal D. Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsia.* 2021;62(1):143–51.
46. Trakadis Y, Accogli A, Qi B, Bloom D, Joobar R, Levy E, et al. Next-generation gene panel testing in adolescents and adults in a medical neuropsychiatric genetics clinic. *Neurogenetics.* 2021;22(4):313–22.
47. Nouri N, Bahreini A, Nasiri J, Salehi M. Clinical and genetic profile of children with unexplained intellectual disability/developmental delay and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2021;177:106782.
48. Duzkale N, Akin R. Frequency of specific genes in different types of epilepsy. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2021;31(11):1296–302.
49. Sotoudeh Anvari M, Vasei H, Najmabadi H, Badv RS, Golipour A, Mohammadi-Yeganeh S, et al. Identification of microRNAs associated with human fragile X syndrome using next-generation sequencing. *Sci Rep.* 2022;12(1):5011.
50. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem.* 2009;55(4):641–58.
51. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1502–11.
52. Bainbridge MN. Determining the incidence of rare diseases. *Hum Genet.* mayo de 2020;139(5):569–74.
53. Telenti A, Pierce LCT, Biggs WH, di Iulio J, Wong EHM, Fabani MM, et al. Deep sequencing of 10,000 human genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016;113(42):11901–6.
54. Ebbert MTW, Jensen TD, Jansen-West K, Sens JP, Reddy JS, Ridge PG, et al. Systematic analysis of dark and camouflaged genes reveals disease-relevant genes hiding in plain sight. *Genome Biol.* 2019;20(1):97.
55. Chaisson MJP, Sanders AD, Zhao X, Malhotra A, Porubsky D, Rausch T, et al. Multi-platform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. *Nat Commun.* 2019;10(1):1784.
56. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020;21(10):597–614.
57. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006;7(2):85–97.
58. Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(7):1648–58.
59. Ciaccio C, Fontana L, Milani D, Tabano S, Miozzo M, Esposito S. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Ital J Pediatr.* 2017;43(1):39.
60. Loomis EW, Eid JS, Peluso P, Yin J, Hickey L, Rank D, et al. Sequencing the unsequenceable: expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene. *Genome Res.* 2013;23(1):121–8.
61. Pretto DI, Eid JS, Yrigollen CM, Tang HT, Loomis EW, Raske C, et al. Differential increases of specific FMR1 mRNA isoforms in premutation carriers. *J Med Genet.* 2015;52(1):42–52.
62. Ardui S, Race V, Zablotskaya A, Hestand MS, Van Esch H, Devriendt K, et al. Detecting AGG interruptions in male and female FMR1 premutation carriers by single-molecule sequencing. *Hum Mutat.* 2017;38(3):324–31.
63. Ardui S, Race V, de Ravel T, Van Esch H, Devriendt K, Matthijs G, et al. Detecting AGG Interruptions in Females With a FMR1 Premutation by Long-Read Single-Molecule Sequencing: A 1 Year Clinical Experience. *Front Genet.* 2018;9:150.
64. Mandelker D, Schmidt RJ, Ankala A, McDonald Gibson K, Bowser M, Sharma H, et al. Navigating highly homologous genes in a molecular diagnostic setting: a resource for clinical next-generation sequencing. *Genet Med.* 2016;18(12):1282–9.
65. Chander V, Mahmoud M, Hu J, Dardas Z, Grochowski CM, Dawood M, et al. Long read sequencing and expression studies of AHDC1 deletions in Xia-Gibbs syndrome reveal a novel genetic regulatory mechanism. *Hum Mutat.* 2022.
66. Abarca-Barriga H, de MV Sotomayor F, Trubnykova M, Velasquez FC, MAC Pastor, BEG Jugo, et al. Variantes en el número de copias en trastornos del neurodesarrollo, síndrome malformativo y talla baja en Perú. *Acta Medica Peruana [Internet].* 2020;37(2) Disponible en: <https://amp.cmp.org.pe/index.php/AMP/article/view/915> [consultado 6 Ago 2020].
67. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bizakadze AV, Mikheenko A, et al. The complete sequence of a human genome. *Science.* 2022;376(6588):44–53.
68. Noyes MD, Harvey WT, Porubsky D, Sulovari A, Li R, Rose NR, et al. Familial long-read sequencing increases yield of de novo mutations. *Am J Hum Genet.* 2022;109(4):631–46.
69. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.