

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Estudio descriptivo de variantes asociadas a desórdenes  
metabólicos por secuenciamiento de nueva generación en  
neonatos de la población ecuatoriana**

Proyecto de Investigación

**Stephany Elizabeth Gallardo Yambay**

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en  
Procesos Biotecnológicos

Quito, 06 de diciembre de 2018

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Estudio descriptivo de variantes asociadas a desórdenes metabólicos por  
secuenciamiento de nueva generación en neonatos de la población  
ecuatoriana**

**Stephany Elizabeth Gallardo Yambay**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Enrique Terán, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 06 de diciembre de 2018

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Stephany Elizabeth Gallardo Yambay

Código:

00123979

Cédula de Identidad:

1723433957

Lugar y fecha:

Quito, 06 de diciembre de 2018

## **DEDICATORIA**

A las familias y niños que han enfrentado la realidad de estas enfermedades catastróficas por su significativo aporte en la ejecución de este proyecto; esperando que a través del mismo se ayude en el desarrollo de nuevas terapias génicas que brinden una mejor calidad de vida a los pacientes que las padecen, otorgando mejores expectativas de diagnóstico para las generaciones futuras.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser el pilar fundamental en mi vida, por su apoyo incondicional en cada una de las experiencias vividas para cumplir esta meta. Gracias por enseñarme que el cielo es el límite.

A mi padre y mi abuelita Marujita, quienes desde el cielo me dan su bendición y fortaleza para seguir adelante.

A Santiago Aguirre, director de este proyecto, gracias por las enseñanzas, la confianza, el apoyo y por compartir cada etapa en la ejecución de este proyecto.

A Enrique Terán por su guía y apoyo para llevar a cabo este estudio.

A Laboratorios Especializados “Netlab” miembro del grupo SYNLAB, por el financiamiento, soporte humano y logístico en la realización del proyecto.

Al equipo de Biología Molecular: Sofi, Lili y Clau, gracias por su amistad y apoyo aún en los días más difíciles.

Al equipo de Comercial, por su aporte en la organización de la Convocatoria Nacional de pacientes.

A Diana Moreno, Ximena Villamizar y a la sede de Laboratorios SYNLAB en Bogotá por su apoyo en la realización de la parte experimental y análisis de datos.

A las familias que acogieron nuestro llamado y dieron su aporte para la ejecución de la investigación.

A mi familia y amigos por su cariño, preocupación y apoyo en cada momento a lo largo de estos años de estudio.

## RESUMEN

A través del tiempo se ha visto un crecimiento exponencial en el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento como el secuenciamiento de nueva generación (NGS); herramienta que es utilizada en la identificación y análisis de variantes a nivel poblacional. A través de ello se pueden desarrollar paneles de las variantes más comunes en la población, creando métodos diagnósticos confirmatorios más acertados y a costos más bajos. Este estudio propone el uso de estas tecnologías para la investigación de variantes asociadas a desórdenes metabólicos, enfocado a las enfermedades analizadas por tamizaje neonatal y ver la correlación fenotipo-genotipo de los pacientes que han sido diagnosticados positivos para alguna de estas patologías. Se vio que la mayor parte de pacientes analizados no tienen diagnósticos asociados a su análisis de exoma. Además se hallaron variantes nuevas asociadas a enfermedades raras, y variantes en genes comunes para todos los pacientes analizados. En conclusión, se vio que el costo beneficio de emplear estas tecnologías es muy alto, pues en varios casos podría incluso salvar vidas y permitir el ahorro de costos de hospitalización. También, se contribuye al establecimiento de la línea de base genética en nuestro país, y esto permite la investigación y desarrollo de nuevas terapias génicas.

*Palabras clave:* Variante genética, desorden metabólico, secuenciamiento de nueva generación, tamizaje neonatal.

## ABSTRACT

An exponential growth has been seen in the development of high performance technologies such as next generation sequencing (NGS); tool that is used in the identification and analysis of genetic variants at the population level. Through this, tests of the most common variants in the population can be developed, creating more accurate confirmatory diagnostic methods at lower costs. This study proposes the use of these technologies for the investigation of variants associated with metabolic disorders, focused on those analyzed by neonatal screening, in order to study the phenotype-genotype correlation of patients who have been diagnosed positive for any of these pathologies. It was seen that most of the patients did not have diagnoses associated with their exome analysis. In addition, new variants associated with rare diseases and variants in common genes were found for all the patients analyzed in this project. In conclusion, it was seen that the application of next generation sequencing is invaluable, because in several cases it could even save lives and reduce hospitalization costs. It also contributes to the establishment of the Ecuadorian genetic baseline, and this will increase research and development of new gene therapies.

*Key words:* Genetic variant, metabolic disorder, next generation sequencing, neonatal screening.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Proyectos de Tamizaje Neonatal</b>	<b>12</b>
1.1.1. Métodos utilizados para realizar el tamizaje neonatal	12
1.1.2. Resultados esperados del tamizaje neonatal	13
<b>1.1.3. Tamizaje Neonatal en Ecuador</b>	<b>13</b>
1.1.4. Enfermedades analizadas	14
1.1.4.1. Hipotiroidismo Congénito	15
1.1.4.2. Fenilcetonuria	16
1.1.4.3. Galactosemia	17
1.1.4.4. Hiperplasia Suprarrenal Congénita	18
1.1.4.5. Fibrosis Quística	18
<b>1.1.5. Tecnologías modernas de secuenciamiento</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>20</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>20</b>
<b>3. ÁREA DE ESTUDIO</b>	<b>21</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>5. MATERIALES</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Extracción de ácidos nucleicos:</b> Inicialmente para cartillas de papel filtro y posteriormente para muestras de sangre periférica de neonatos de la población ecuatoriana.	<b>23</b>
<b>5.2 Cuantificación de ácidos nucleicos:</b> Se utilizaron métodos fluorométricos y análisis de fragmentos validados para ensayos de secuenciamiento de nueva generación (NGS).	<b>23</b>
<b>5.3 Preparación de librerías para secuenciamiento de próxima generación</b>	<b>24</b>
<b>5.4 Secuenciamiento de próxima generación (NGS)</b>	<b>24</b>
<b>5.5 Análisis de datos</b>	<b>24</b>
<b>5.6 Filtrado de variantes</b>	<b>24</b>
<b>6. MÉTODOS</b>	<b>25</b>
6.1. Extracción de ADN de las cartillas de papel filtro (tarjeta de Guthrie)	25
6.2. Convocatoria Nacional de pacientes y Toma de muestras	26
6.3. Extracción de ADN a partir de sangre periférica	26
6.4. Cuantificación de ácidos nucleicos	26
6.5. Preparación de la biblioteca genómica	27
6.6. Amplificación de las regiones fragmentadas	27
6.7. Secuenciamiento de próxima generación, análisis e interpretación de datos	27
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
7.1 Resumen de Casos de pacientes con Hiperplasia Suprarrenal congénita (CAH)	29
7.2 Resumen de Casos de pacientes con Fibrosis Quística	30
7.3 Resumen de Casos de pacientes con Hipotiroidismo Congénito (CH)	31
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>44</b>



<b>11. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>45</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo 1. Principales variantes puntuales de las enfermedades analizadas por el Tamizaje Neonatal en Ecuador .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo 2. Gráficas de coberturas obtenidas mediante el secuenciamiento de nueva generación para las enfermedades analizadas.....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 3. Variantes encontradas en los diferentes casos positivos asociados a las diferentes patologías.....</b>	<b>61</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA</b>	<b>61</b>
<b>TABLA 2. VARIANTES ADICIONALES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA</b>	<b>61</b>
<b>TABLA 3. RESUMEN DE COBERTURAS PARA PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA</b>	<b>62</b>
<b>TABLA 4. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA</b>	<b>62</b>
<b>TABLA 5. RESUMEN DE COBERTURAS PARA PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA</b>	<b>62</b>
<b>TABLA 6. VARIANTES ADICIONALES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA</b>	<b>63</b>
<b>TABLA 7. VARIANTES PATOGENICAS HALLADAS EN EL GEN CFTR EN LA POBLACIÓN ECUATORIANA.</b>	<b>63</b>
<b>TABLA 8. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTE 3 CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO</b>	<b>64</b>
<b>TABLA 9. VARIANTES ADICIONALES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTE 3 CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO</b>	<b>64</b>
<b>TABLA 10. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTE 4 CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO</b>	<b>65</b>
<b>TABLA 11. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTE 5 CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO</b>	<b>65</b>
<b>TABLA 12. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTE 6 (CASO SOSPECHOSO)</b>	<b>66</b>
<b>TABLA 13. VARIANTES ADICIONALES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE EXOMA PARA PACIENTE 6 (CASO SOSPECHOSO)</b>	<b>66</b>
<b>TABLA 14. RESUMEN DE COBERTURAS PARA PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO</b>	<b>68</b>
<b>TABLA 15. VARIANTES ENCONTRADAS EN EL GEN PRSS1 EN VARIOS PACIENTES DEL ESTUDIO</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>ILUSTRACIÓN 1. SNPs ASOCIADOS AL HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO .....</b>	<b>58</b>
<b>ILUSTRACIÓN 2. SNPs ASOCIADOS A FENILCETONURIA .....</b>	<b>58</b>
<b>ILUSTRACIÓN 3. SNPs ASOCIADOS A GALACTOSEMIA.....</b>	<b>59</b>
<b>ILUSTRACIÓN 4. SNPs ASOCIADOS A HIPERPLASIA SUPRARRENAL .....</b>	<b>59</b>
<b>ILUSTRACIÓN 5. COBERTURA PROMEDIO POR REGIÓN DE INTERÉS PARA PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA .....</b>	<b>60</b>
<b>ILUSTRACIÓN 6. COBERTURA PROMEDIO POR REGIÓN DE INTERÉS PARA PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA.....</b>	<b>60</b>
<b>ILUSTRACIÓN 7. COBERTURA PROMEDIO POR REGIÓN DE INTERÉS PARA PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO. ....</b>	<b>61</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Proyectos de Tamizaje Neonatal

Los proyectos de tamizaje neonatal, surgieron con el objetivo de eliminar o disminuir efectos adversos de enfermedades catastróficas que conducen principalmente a muerte precoz y retraso mental en recién nacidos (Cifuentes, 2016; Figueroa & Morante, 2014; Kwan et al., 2014; Morales, 2011).

El desarrollo de estos programas a principios de 1960 no estaba siendo considerado como una prioridad en salud pública, pero con el paso del tiempo se fueron creando políticas de Estado que incluyeron estos programas dentro de sus servicios de salud preventiva especialmente en países de primer mundo como Estados Unidos, donde millones de individuos se benefician de este programa de prevención (Therrell, Johnson, & Williams, 2006; Welling et al., 2017).

El tamizaje neonatal se basa en el análisis de errores metabólicos que se presentan en los neonatos, y corresponden a un grupo de desórdenes a nivel genético que en caso de desarrollarse pueden generar consecuencias clínicas muy graves, que al no ser tratadas y diagnosticadas a tiempo pueden desencadenar en daños mentales y neurológicos irreversibles, discapacidad mental, e incluso muerte precoz. Su detección es difícil para los médicos, ya que generalmente no se manifiestan clínicamente, por ello aunque la frecuencia e incidencia de estos trastornos no es muy alta; se debe considerar su importancia en salud pública a nivel colectivo (Pandor, Eastham, Beverley, Chilcott, & Paisley, 2004).

### 1.1.1. Métodos utilizados para realizar el tamizaje neonatal

La prueba de cribado neonatal se realiza usando papel filtro (Tarjetas Guthrie) en donde se colocan de 3 a 4 gotas de sangre capilar del talón derecho de los recién nacidos de entre

cuatro a siete días de vida extrauterina (Evia, 2004). Los métodos aplicados para la detección de estas enfermedades metabólicas, varían de acuerdo a la enfermedad a analizar y van desde espectrofotometría de masas en tándem, pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), microfluorometría (MFM), radioinmunoanálisis (RIA), entre otras (Evia, 2004).

### **1.1.2. Resultados esperados del tamizaje neonatal**

Los resultados obtenidos permiten determinar si los casos son normales, es decir con los valores normales de referencia; si son elevados refiere a pacientes que presentan la primera muestra con altos niveles de corte para al menos una de las cuatro enfermedades metabólicas. Los casos sospechosos son pacientes que fueron casos elevados y que presentan resultados constantemente elevados para alguna de las enfermedades. Finalmente, los casos positivos refieren a casos sospechosos que fueron confirmados con pruebas adicionales en laboratorios nacionales o internacionales y que fueron corroborados por un diagnóstico del médico (Madariaga, 2014).

### **1.1.3. Tamizaje Neonatal en Ecuador**

En el Ecuador el apareamiento del tamizaje neonatal fue tardío, puesto que inició el 2 de diciembre de 2011, día de la discapacidad intelectual, cuando la Vicepresidencia de la República del Ecuador junto con el Ministerio de Salud Pública lanzó el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal “Con Pie Derecho, la Huella del Futuro” para prevenir la discapacidad intelectual y muerte precoz en neonatos, a través de una pronta detección que permita un tratamiento adecuado y a tiempo (Figuerola & Morante, 2014). Al ser una estrategia de medicina preventiva, su servicio se extiende a todos los recién nacidos del país de forma

gratuita en todas las unidades de salud pertenecientes a la Red Pública Integral de Salud y la Red Privada complementaria (Figueroa & Morante, 2014).

Las cifras de pacientes nacidos vivos tamizados en el período 2011-2015 va de 97.657 a 1'159.648 niños, con 243 beneficiados con tratamientos integrales que evitaron el padecimiento de discapacidad intelectual o muerte precoz (Ministerio de Salud Pública, 2017). Para el 2011 se tamizaron más de 10.300 niños de menos de un año de edad, con un índice de seis casos positivos (Ministerio de Salud Pública, 2017). Para el año 2012 la cifra se incrementó a 41 casos positivos de 166.000 niños tamizados. En el 2013, se logró prevenir el efecto catastrófico de estas enfermedades en 114 niños de 225.436 niños tamizados (Figueroa & Morante, 2014). Adicionalmente, cada uno de los 161 niños que fueron diagnosticados a tiempo; recibieron tratamientos de salud completos y gratuitos que incluyen controles médicos, terapias, tratamientos nutricionales y medicinas de manera continua a lo largo de su vida pudiendo ser atendidos en los centros de salud más cercanos (Figueroa & Morante, 2014). En el 2014, un estudio de 225 922 pacientes, con 61 casos confirmados para algún desorden metabólico de los cuatro analizados en el tamizaje en el país; se determinó una prevalencia de 68.85% para hipotiroidismo congénito, un 15% para fenilcetonuria, seguido de un 11% para hiperplasia suprarrenal congénita y un 5% para galactosemia (Ortiz & Villacís, 2015).

#### **1.1.4. Enfermedades analizadas**

Los errores innatos del metabolismo corresponden a enfermedades congénitas de componente hereditario difíciles de diagnosticar por la clínica del paciente y que pueden desencadenar retraso mental, discapacidad o incluso la muerte (Ortiz & Villacís, 2015). De acuerdo al enfoque clínico para la detección se han clasificado en tres grupos: el primero refiere a errores innatos del metabolismo intermedio que pueden generar una intoxicación aguda o crónica, en este grupo se incluyen intolerancias a azúcares, desórdenes del ciclo de la urea,

porfirias, aminoacidopatías, etc.; siendo la mayoría de estas tratables mediante la eliminación de la toxina, por ejemplo a través de cambios en la dieta. Cabe destacar que no son curables de forma definitiva (Saudubray, Sedel, & Walter, 2006). El segundo grupo engloba errores metabólicos que interfieren en los procesos energéticos a nivel del citoplasma y de la mitocondria. La mayoría de ellos, no se pueden tratar clínicamente a excepción de aquellos relacionados con la oxidación de ácidos grasos y cuerpos cetónicos (Burton, 1998). El último grupo contiene aquellos errores a nivel de organelas celulares, incluyendo defectos en la glicosilación, en la síntesis del colesterol, de lisosomas y peroxisomas, siendo algunos de ellos tratables con terapias de reducción de sustrato o reemplazo de ciertas enzimas (Saudubray et al., 2006).

Es importante conocer que algunas de ellas pueden heredarse de manera autosómica recesiva, autosómica dominante o ligadas al cromosoma X; otras también se presentan por defectos hormonales congénitos como en el caso de la hiperplasia suprarrenal y el hipotiroidismo (Therrell et al., 2006). En Ecuador, el Programa se enfoca en la prevención de cuatro enfermedades principales: asociadas a discapacidad intelectual (Hipotiroidismo y Fenilcetonuria) y relacionadas con discapacidad intelectual y muerte precoz (Galactosemia e Hiperplasia Suprarrenal) (Ministerio de Salud Pública, 2017).

#### ***1.1.4.1. Hipotiroidismo Congénito***

Es un desorden metabólico neonatal, conocido como una de las causas más comunes de retraso mental que desencadena un grave deterioro del neurodesarrollo e infertilidad. Ocurre en aproximadamente 1:2 000-1:4 000 neonatos (Anjum, Afzal, Iqbal, Sultan, & Hanif, 2014). Esta endocrinopatía se presenta por una deficiencia en la producción de las hormonas tiroideas a nivel hipotálamo-hipofisario, por hipotiroidismo primario o periférico (Ortiz & Villacís, 2015; Park, 2005). La deficiencia de la hormona tiroidea al nacer, afecta en el desarrollo normal

del sistema nervioso central (Park, 2005). La falta de manifestaciones clínicas de la misma, destaca la importancia de su incorporación en el tamizaje, donde se analiza la hormona T4, TSH o ambas. Su diagnóstico se confirma al encontrar elevados índices de TSH en suero (American Academy of Pediatrics, American Thyroid Association & Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, 2006).

En cuanto a la incidencia: en Estados Unidos es de 1:3 600; 1:7 700 en Japón, 1:9 390 en Brasil y de 1:3 840 en Ecuador con una tasa de 2.6 por 1 000 neonatos, siendo una de las tasas de incidencia más altas en América Latina (Evia, 2004). Algunas variantes asociadas al gen *TSHR* son: p.P52T, p.G132R, p.M164K, p.R450H, p.C700E, p.A522V y p.R528S); donde las variantes p. G132R, p. M164K y p. R528S han sido recientemente identificadas en un grupo de 100 pacientes chinos con hipotiroidismo congénito y atireosis (Wang et al., 2017). Otras variantes asociadas se han descubierto en los genes *TPO* (391T>C (S131P), 1274A>G (N425S) y 2512T>A (C838S) (Rodrigues et al., 2005); *FOXE1*, *DUOX2*, *TG*, *SLC26A4* (Fan et al., 2017), *NKX2-1*, *NKX2-5* y *PAX8* (van Engelen et al., 2012). Además, se hallaron 13 variantes que inactivan el gen *SLC5A5* asociado al cotransportador sodio/yodo (*V59E*, *G93R*, *R124H*, *Q267E*, *C272X*, *G395R*, *T354P*, *fs515X*, *Y531X*, *DelM143-Q323*, *DelV287-G288*, *DelA439-P443*, y *G543E*) (Grasberger & Refetoff, 2011). Otras variantes puntuales asociadas a esta enfermedad se detallan en la Tabla 1 del Anexo 1.

#### **1.1.4.2. Fenilcetonuria**

Es un error del metabolismo de carácter autosómico recesivo que se genera por alelos mutantes que afectan la integridad y función de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH), la cual es codificada por el gen *PAH* localizado en el cromosoma 12 (Hardelid et al., 2008). *PAH* tiene la capacidad de convertir fenilalanina en tirosina usando el cofactor BH<sub>4</sub>, oxígeno molecular y hierro, cuando se altera la función enzimática se generan grandes concentraciones



de fenilalanina, lo que se conoce como hiperfenilalaninemia (Blau, van Spronsen, & Levy, 2010). Esto desencadena problemas en el desarrollo cognitivo postnatal, con síntomas como: retardo mental, eczemas, autismo, convulsiones y déficits en la actividad motora, por lo que fue una de la primera en incluirse en los programas de tamizaje neonatal (Evia, 2004). Además, este fue uno de los primeros desórdenes metabólicos para los que se identificó un tratamiento potencial mediante una dieta baja en fenilalanina para permitir el desarrollo normal del cerebro (Ortiz & Villacís, 2015). Su incidencia varía a nivel mundial, con 1:10 000 nacimientos en Europa, mientras que en América Latina varía entre 1:50 000 a 25 000 nacidos vivos. En México se tiene 1:70 082 y en Argentina 1:1 467 con una tasa de 0.681 por 1 000 recién nacidos (Hardelid et al., 2008). Las variantes prevalentes asociadas se detallan en la Tabla 2 del Anexo 1.

#### ***1.1.4.3. Galactosemia***

Esta enfermedad autosómica recesiva refiere a desórdenes o errores en el metabolismo de la galactosa ocasionados por una deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), la cual convierte la GAL-1-P y la uridindifosfato galactosa-epimerasa en UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato (Welling et al., 2017). La ingesta de la leche materna o de fórmula en los recién nacidos genera graves consecuencias, ya que contiene galactosa y por deficiencias metabólicas se desencadenan fallas hepáticas, disfunción renal, sepsis, entre otras., que pueden evitarse con una dieta libre de este compuesto. A pesar de ello, si el tratamiento no se lleva a cabo de forma temprana se generan problemas más severos como deficiencias de lenguaje, complicaciones neurológicas, disminución de la densidad de la masa ósea, deterioro de la capacidad cognitiva, y en algunos casos se presenta hipogonadismo hipergonadotrópico en mujeres (Viggiano et al., 2015). Su incidencia varía de 1 en 30 000-60 000 nacidos vivos (Porta, Pagliardini, Pagliardini, Ponzzone, & Spada, 2015). Se han reportado

más de 250 variantes para la GALT, siendo la mayor parte de ellas variantes con cambio de sentido (Viggiano et al., 2015). Las variantes más frecuentes asociadas a este trastorno se detallan en la Tabla 3 del Anexo 1.

#### **1.1.4.4. Hiperplasia Suprarrenal Congénita**

Engloba un conjunto de desórdenes autosómicos recesivos en la esteroidogénesis suprarrenal (Liu et al., 2018). Una de las causas etiológicas principales es la deficiencia de la 21-hidroxilasa (21-OHD), lo que conlleva una disminución y falta de cortisol y aldosterona, generando una acumulación de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) y andrógeno suprarrenal (Parsa & New, 2017). De acuerdo a la deficiencia enzimática se puede clasificar en dos tipos por crisis de pérdida de sales o por virilización femenina (Evia, 2004). Algunos síntomas que se presentan son virilización de genitales externos en neonatos femeninos y en niños que están alcanzando la pubertad, debido a una tasa de sobreproducción de andrógenos (Gialluisi et al., 2018). Los pacientes que padecen la crisis de pérdida de sal presentan manifestaciones clínicas como hipovolemia, hipercalemia, hiperreninemia, shock e inclusive la muerte del neonato en un corto período de tiempo de aproximadamente 1 a 4 semanas después del parto (Fleming, Riper, & Knafl, 2017). La incidencia de este trastorno metabólico es de 1:13 000 a 1:15 000 nacidos vivos (Parsa & New, 2017). Se conoce que el gen *CYP21A2* que codifica para para la 21-OHD, contiene variantes asociadas a la inactivación del pseudogen *CYP21A1P*.

#### **1.1.4.5. Fibrosis Quística**

Refiere a una entidad multisistémica autosómica recesiva generada por variantes en el gen regulador de la conductancia transmembrana (CFTR) el cual codifica para la proteína reguladora encargada del transporte de iones de cloro dentro y fuera de la célula, actuando a manera de un canal que permite la regulación de otros canales iónicos como los de  $\text{HCO}_3^-$  y

Na<sup>+</sup> (Quon & Rowe, 2016). La ausencia o alteraciones en la proteína CFTR, afectan el transporte de cloruro y bicarbonato, lo cual puede manifestarse clínicamente con enfermedades pulmonares obstructivas progresivas con bronquiectasias, insuficiencia pancreática, enfermedades hepáticas, desórdenes en la motilidad intestinal, altas concentraciones de electrolitos en el sudor, bronquitis, sinusitis, desnutrición e infertilidad masculina (Cutting, 2015). Se conocen aproximadamente 2 000 mutaciones en el gen *CFTR* desde su descubrimiento en 1989, de las cuales 242 han sido reportadas como causantes de la enfermedad (Brennan & Schrijver, 2016; Quon & Rowe, 2016). La incidencia en nuestro país es de 1: 11 252 nacidos vivos; un estudio previo estableció la prevalencia de mutaciones asociadas al gen *CFTR* en nuestra población, refiriendo un panel de las 10 mutaciones más prevalentes, en el cual se encontró que la variante *p.H609R* es la segunda más prevalente en la población (Ortiz et al., 2017).

#### **1.1.5. Tecnologías modernas de secuenciamiento**

Se ha elegido emplear tecnologías modernas de secuenciamiento, considerando que a través de ellas se pueden hacer análisis del genoma o exoma completo de un individuo (Hollegaard et al., 2013; Howard et al., 2015; Pandor et al., 2004) además su versatilidad permite que se apliquen en diferentes campos, y se espera que sean disponibles para la mayoría de la población (Hayeems et al., 2015). Adicionalmente, en países como Estados Unidos ya se ha estudiado el enfoque y aplicación de estas técnicas relacionadas con proyectos de tamizaje neonatal (Howard et al., 2015).

Con este tipo de secuenciamiento, se espera identificar variantes genéticas que inciden en el riesgo de que los pacientes padezcan o no de este tipo de enfermedades. Las principales ventajas de su aplicación son la reducción de costos y tiempo para el análisis de secuencias de todo el genoma humano, además de las potenciales utilidades que pueden conferir en la

transformación de la medicina y salud pública permitiendo la generación de diagnósticos y medicina personalizada (Taber, Dickinson, & Wilson, 2014). Estudios previos han demostrado que es una técnica robusta y que incluso en algunos casos puede sustituir métodos como el análisis de espectrofotometría de masas en tándem (Hollegaard et al., 2013), permitiendo que la información obtenida de los análisis se encuentre a disposición del paciente para futuros usos de los mismos. El uso de estas tecnologías en neonatos permitirá convertirlas en una prueba de rutina que se realice en los niños al nacer, para generar mapas de sus marcadores genéticos; así se almacenarían los datos electrónicamente en el récord del paciente lo que permitiría que puedan ser usados a futuro, para hacer la prevención y tratamiento adecuados y a su medida, generando la posibilidad de analizar cómo se relacionan ciertos genes con el riesgo de padecer enfermedades o en la respuesta a diferentes medicamentos (Biesecker, Burke, Kohane, Plon, & Zimmern, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Identificar variantes genéticas asociadas a desórdenes metabólicos mediante secuenciamiento de nueva generación (NGS) en neonatos de la población ecuatoriana.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- a) Analizar los tipos de variantes en genes asociados a enfermedades metabólicas en neonatos.
- b) Identificar si las variantes encontradas son patogénicas, probablemente patogénicas, benignas, probablemente benignas o de significado incierto (VUS).
- c) Aplicar el secuenciamiento de ADN de nueva generación como apoyo para el diagnóstico en el tamizaje neonatal en pacientes con diagnóstico positivo para alguna de las enfermedades analizadas.

- d) Correlacionar las variantes genéticas encontradas con las manifestaciones clínicas en los casos sospechosos sometidos a tamizaje neonatal.
- e) Verificar si las variantes encontradas han sido previamente reportadas en la literatura.

### 3. ÁREA DE ESTUDIO

La ejecución de este proyecto se llevó a cabo en el Área de Biología Molecular de “NETLAB”, Laboratorios Especializados de Referencia miembro del grupo “SYNLAB” donde se ejecutó la selección de pacientes, la toma de muestras, las pruebas de los protocolos de extracción a partir de cartillas de papel filtro y la cuantificación de ácidos nucleicos mediante métodos fluorométricos con plataformas como *Qubit*. Los ensayos de secuenciamiento de nueva generación (NGS) y análisis de datos se realizaron en la sede de Laboratorios “SYNLAB” en la ciudad de Bogotá. Se contactó con más de 400 pacientes de varios puntos del país que presentaron diferentes tipos de desórdenes metabólicos, mediante una Convocatoria Nacional realizada por “NETLAB” a través de redes sociales.

Se realizó la toma de muestras en diversas ciudades del país y para efecto de este estudio se referirá el análisis a detalle de 6 pacientes que presentaron diagnóstico positivo para alguna de las enfermedades analizadas por el tamizaje y para pacientes con fibrosis quística. Se incluyó un caso sospechoso pues carecía de evidencia clínica y el estado del paciente era crítico. Adicionalmente, la realización de este estudio fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco De Quito.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Considerando que de cada mil niños nacidos en el Ecuador, uno tiene enfermedades metabólicas que generan efectos irreversibles como discapacidad intelectual, que no presentan manifestaciones clínicas (Morales, 2011), y que, para el 2010 se detectaron más de 290 000 personas con discapacidad, de la cuales un porcentaje cercano al 25% padece discapacidades intelectuales (Ministerio de Salud Pública, 2017). Se enfatiza en la necesidad de complementar el tamizaje neonatal con un estudio que nos permita comprender la base genética de los desórdenes metabólicos, especialmente, la identificación de variantes asociadas a las enfermedades analizadas por el tamizaje neonatal en nuestra población.

A través de este trabajo se espera identificar variantes asociadas a desórdenes metabólicos mediante análisis de exomas clínicos (*target sequencing*) que nos permitan crear paneles de las variantes más comunes en nuestra población como se ha logrado en estudios previos para enfermedades como la fibrosis quística (Ortiz et al., 2017); analizando si el fenotipo de los pacientes diagnosticados como positivos para alguna patología del tamizaje neonatal, se correlaciona con el análisis de exoma mediante NGS.

Esto además, se constituirá en un pilar para la realización de los análisis confirmatorios asociados a estas enfermedades metabólicas, puesto que permitirá conocer la base genética de las mismas, haciendo posible la creación de una gama de aplicaciones del secuenciamiento de próxima generación, que pueden ir, desde la creación de análisis de portadores, hasta aportes en el diagnóstico clínico en algunos casos sospechosos donde las manifestaciones clínicas no son suficientes para llegar al tratamiento acertado.

A nuestro conocimiento este es el primer estudio de variantes asociadas a desórdenes metabólicos mediante secuenciamiento de nueva generación en el país; lo cual nos permite estudiar el espectro completo de genes en los que incluso podría no existir una sospecha clínica

previa. De esta manera se ayudará al establecimiento de la línea de base genética en el país, lo cual permitirá un incremento en el desarrollo e investigación de nuevas terapias génicas contribuyendo con mejores pruebas diagnósticas para las generaciones futuras.

## 5. MATERIALES

**5.1 Extracción de ácidos nucleicos:** Inicialmente para cartillas de papel filtro y posteriormente para muestras de sangre periférica de neonatos de la población ecuatoriana.

### **Para cartillas de papel filtro:**

- Cartillas de papel filtro (*Guthrie Cards*)
- Buffer FTA
- PBS
- Proteinasa K
- Etanol (70%)
- Columnas de extracción
- Kit de Extracción de Roche (*High Pure PCR Template Preparation Kit*)

### **Para muestras de sangre periférica:**

- Jeringas, agujas, material para flebotomía
- Tubos EDTA
- Kit de Extracción de Roche (*High Pure PCR Template Preparation Kit*)
- Kit *QiAmp DNA Blood* de Qiagen

**5.2 Cuantificación de ácidos nucleicos:** Se utilizaron métodos fluorométricos y análisis de fragmentos validados para ensayos de secuenciamiento de nueva generación (NGS).

### **Para cartillas de papel filtro:**

- Qubit® 3.0 (Thermo)

**Para sangre periférica:**

- Qubit® 3.0 (Thermo)
- Quantus (Promega)

**Análisis de Fragmentos:**

- *Fragment Analyzer*

**5.3 Preparación de librerías para secuenciación de próxima generación**

- TruSight Rapid Capture Kit

**5.4 Secuenciación de próxima generación (NGS)**

- TruSight One Kit
- MiSeq

**5.5 Análisis de datos**

- Software de análisis: *BWA*, *GATK* y *VariantStudio*.
- Análisis WGGT: *GenomeStudio* y *Beeline*

**5.6 Filtrado de variantes**

- Bases de datos: *ClinVar*, *UNIPROT*
- Herramientas predicción *in silico*: *SIFT*, *Polyphen*, *Mutation Taster* y *Alamut*
- Bases de frecuencia poblacional: *ExAC* y 1 000 Genomas



## 6. MÉTODOS

Previo a la realización de la parte experimental, se solicitó la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito.

Para la extracción de ácidos nucleicos se trabajó con dos matrices, inicialmente se empleó cartillas de papel filtro que se han usado en el proyecto de Tamizaje Neonatal pertenecientes a pacientes que fueron reportados como casos positivos o sospechosos en el período Junio 2017- Mayo 2018. Para esto, se procedió de la siguiente manera:

### 6.1. Extracción de ADN de las cartillas de papel filtro (tarjeta de Guthrie)

Las cartillas de papel filtro secas utilizadas para este estudio provienen de pacientes (neonatos que presentaron casos positivos/ sospechosos) mediante el análisis del tamizaje neonatal. El proceso de toma de sangre se da en la cartilla, la cual posee un papel filtro que garantiza la estabilidad de la muestra, para su posterior elución y análisis. Las cuatro gotas de sangre se colocan en la cartilla y son obtenidas del talón derecho del recién nacido. La extracción de ADN se realizó mediante el uso de buffers específicos en los discos de la cartilla de papel filtro, mediante un nuevo protocolo establecido para este proyecto en el Área de Biología Molecular de NETLAB, se realizaron incubaciones nocturnas de los discos de la cartilla en PBS con enzimas y reactivos de lisis previo a la extracción. Se buscó la estandarización de un protocolo para obtener suficiente concentración de ADN de buena calidad, y aunque no se estableció un protocolo para estudios de tipo NGS, se estandarizó un protocolo de extracción de ADN a partir de cartillas de papel filtro para realizar pruebas diagnósticas por PCR en tiempo real.

## **6.2. Convocatoria Nacional de pacientes y Toma de muestras**

En vista de la dificultad para recuperar ácidos nucleicos de las cartillas de papel filtro, se buscó una forma de comunicación masiva para llamar a los pacientes que hayan sido diagnosticados para alguna de estas patologías para hacer una toma de sangre periférica, para lo cual se realizó una Convocatoria Nacional de pacientes mediante redes sociales, la cual a nuestro conocimiento es de las primeras en realizarse en el país con el objetivo de llamar a pacientes con estas patologías. A través de ésta se contactó con más de 400 pacientes de diferentes puntos del país quienes presentaron diversos desórdenes metabólicos. Luego, se realizó una selección de los pacientes que entraban al estudio. Los que fueron aceptados y decidieron entrar voluntariamente al estudio firmaron un consentimiento informado y se realizó la toma de muestra de los pacientes. Para esto se extrajeron tubos de sangre periférica en EDTA correspondientes a cada paciente.

## **6.3. Extracción de ADN a partir de sangre periférica**

Se trabajó con 200uL de sangre periférica de cada paciente mediante el protocolo de los kit *High Pure PCR Template Preparation* de Roche, y *QiAmp DNA Blood* de Qiagen.

## **6.4. Cuantificación de ácidos nucleicos**

Se empleó técnicas de fluorimetría, puesto que son recomendadas para ensayos de secuenciación de nueva generación. Se trabajó con las plataformas Qubit® 3.0 (Thermo) y Quantus (Promega) y se trabajó de acuerdo a los protocolos de cada kit correspondientes a cada una de las plataformas.

### **6.5. Preparación de la biblioteca genómica**

Se preparó una biblioteca indexada a partir de 50ng de ADN con metodologías del kit “*TruSight One*” de Illumina, para ello las muestras siguieron un flujo de trabajo basado en la fragmentación del ADN genómico, seguido de un ligamiento de las secuencias adaptadoras. Se purificó el ADN fragmentado por los transposomas con partículas magnéticas para descartar inhibidores y sustancias de interferencia (Illumina, 2016).

### **6.6. Amplificación de las regiones fragmentadas**

Se amplificó el ADN fragmentado y purificado con el kit “*TruSight One*” de Illumina, se añadió los adaptadores usando programas de termociclado de 10 ciclos y se volvió a purificar el ADN amplificado. Luego se hibridaron sondas de captura a las regiones target de ADN. Se capturaron las sondas hibridadas con partículas magnéticas de estreptavidina, se hicieron lavados y eluciones de las partículas, se volvió a hibridar las regiones enriquecidas de ADN con las sondas de captura, se realizó una segunda captura, una purificación y amplificación de la biblioteca (Illumina, 2016). Se purificó y cuantificó las librerías usando métodos de fluorometría y análisis de fragmentos en la plataforma *Fragment Analyzer*.

### **6.7. Secuenciamiento de próxima generación, análisis e interpretación de datos**

Se trabajó con las bibliotecas enriquecidas previamente, usando el kit “*TrueSight One*” y se realizó la secuenciación masiva mediante la plataforma MiSeq®. Este kit es capaz de detectar mutaciones puntuales y pequeñas inserciones/deleciones (ins/del) a lo largo de la secuencia codificante y la región intrónica flanqueante de los 4811 genes analizados. Se realizó la alineación con el genoma de referencia [GRC37.12 (HG19)].

Se definieron varios criterios para el análisis, anotación y priorización de variantes siguiendo las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) (Richards et al., 2015) y se utilizó la nomenclatura para las variantes de acuerdo a lo establecido por las recomendaciones de *Human Genome Variation* (HGVS). Cabe destacar que no se utilizará el término mutación, dado que existe un consenso en la literatura de unificar los términos “polimorfismo” y “mutación” como *variante*, entendiéndose como mutación un cambio permanente en la secuencia nucleotídica, y como polimorfismo una variante con una frecuencia mayor al 1% (Richards et al., 2015). De esta manera las variantes han sido clasificadas en 5 categorías que incluyen: patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto (VUS), probablemente benigna y benigna.

Para analizar los datos obtenidos del secuenciamiento, se usó el software de Illumina y una plataforma adicional (*SOPHIA GENETICS* v.5.1.6.1) como se detalló en la sección de metodología del estudio.

Adicionalmente, esto debe ser correlacionado con parámetros de evidencia poblacional como ExAC y 1 000 Genomas, de predicción *in silico* (*SIFT*, *Polyphen*, *Mutation Taster* y *Alamut*) funcional y de segregación (MacArthur et al., 2014). Además, se consideró la evidencia clínica recopilada en bases de datos de acceso libre como *ClinVar* y *VarSome*, donde se refiere información de reportes clínicos que asocian la relación entre fenotipos y *variantes* de importancia clínica (Landrum et al., 2014).

## **7. RESULTADOS**

Serán presentados a manera de casos en función del gran número de variantes que se obtuvieron al efectuar el análisis bioinformático de los casos positivos en el período Junio 2017- Mayo 2018. Para anonimizar la base de datos, se referirá a cada paciente con un número

y se detallará lo que se conoce sobre su cuadro clínico, los hallazgos a nivel de exoma, entre otros datos significativos para el estudio enfocado a cada desorden metabólico.

### **7.1 Resumen de Casos de pacientes con Hiperplasia Suprarrenal congénita (CAH)**

Paciente 1 de sexo femenino, lactante menor de 11 meses de vida presenta niveles elevados de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) con valores superiores al nivel de referencia (>180 nmol/L) en los resultados de Tamizaje Neonatal del Programa de Salud Pública del país. Recibe tratamiento para Hiperplasia Suprarrenal congénita, debido a su clínica y a los antecedentes familiares donde varios miembros padecen de la misma enfermedad. Después del análisis de exoma clínico (*target sequencing*) mediante el kit *TruSight One* de Illumina, se detectaron 9 220 cambios respecto al genoma de referencia [GRC37.12 (HG19)]. Posteriormente, se realizó un análisis selectivo de genes relacionados con el diagnóstico o fenotipo clínico de la paciente, destacándose entre los hallazgos más importantes dos variantes patogénicas en el gen *CYP21A2*, asociadas a Hiperplasia suprarrenal congénita (CAH) (MIM201910) mismas que se detallan en la Tabla 1. Se sugiere un análisis de segregación para verificar si la paciente es heterocigoto compuesto pues presenta dos variantes diferentes en estado heterocigoto lo cual ha sido reportado en este tipo de pacientes (Simpson & Hughes, 2017) y concuerda con el patrón de heredabilidad de esta enfermedad el cual es autosómico recesivo. Se destaca una cobertura mayor a 30X para las dos variantes.

La variante c.518T>A, p.Ile173Asn en estado heterocigoto ha sido descrita como patogénica en la base de datos *ClinVar* (dos estrellas), y refiere a una variante tipo *missense* la cual genera un cambio del aminoácido Isoleucina por Asparagina en la posición 173 de la proteína. Mientras que la variante c.844G>T, p.Val282Leu en estado heterocigoto tiene 11 sometimientos que la describen como patogénica, esta refiere a un cambio del aminoácido Valina por Leucina en la posición 282 de la proteína. La cobertura del análisis se encuentra

detallada en la Tabla 3, y adicionalmente se obtuvo una gráfica (Ver Figura 1) con una cobertura o profundidad promedio mayor a 100X por región de interés. Adicionalmente, se hallaron 6 variantes de interés (Ver Tabla 2) de las cuales dos se clasifican como patogénicas y se encuentran en los genes *MPO* y *PQBPI*. Así como 4 clasificadas como VUS o de significancia incierta en genes de gran importancia como el *CFTR*, *PRSSI* y *SLC4A1*.

## 7.2 Resumen de Casos de pacientes con Fibrosis Quística

Paciente 2 de sexo masculino, lactante mayor de 2 años presenta varios test de sudor positivo, recibe tratamiento para la enfermedad, y tiene diagnóstico molecular de la enfermedad por secuenciamiento de Sanger. Después del análisis de exoma clínico (*target sequencing*) mediante el kit *TruSight One* de Illumina, se detectaron 8 923 cambios respecto al genoma de referencia [GRC37.12 (HG19)]. Mediante un análisis selectivo de genes relacionados con el diagnóstico o fenotipo clínico del paciente, se detectó la variante c.1521\_1523delCTT, p.Phe508delPhe en estado homocigoto en el gen *CFTR*- NM\_000492.3 (Ver detalle en Tabla 4) misma que concuerda con la herencia autosómica recesiva de esta enfermedad. Su frecuencia en bases de datos como *ExAC* es de 0.006785, y ha sido descrita como patogénica en bases de datos como *LOVD* (Leiden Open (source) Variation Database) y *ClinVar* esta variante es de tipo “*inframe deletion*” donde se da una pérdida del aminoácido Fenilalanina en la posición 508 de la proteína, generando un bloqueo en el procesamiento de la misma. *UNIPROT* refiere que la variante ubicada en el dominio NBD1 (cytoplasmic nucleotide-binding domain) afecta la maduración de la cadena de glicanos (Chen, Huang, & Wu, 2017). Adicionalmente, se detallan otras variantes patogénicas halladas en el exoma clínico del paciente en la Tabla 6, donde todas son de tipo “*missense*” es decir que refieren a un cambio diferente en un nucleótido que genera un aminoácido diferente (Dunnen et al., 2016) y se expresan en estado heterocigoto. Las patologías asociadas son Fenilcetonuria (*PAH*), Síndrome de *Aicardi Goutieres*

(*RNASEH2B*) y enfermedad de Wilson (*ATP7B*). Adicionalmente, se correlacionaron los resultados con un estudio previo de prevalencia realizado en el área de Biología Molecular de “Netlab” donde se reportó un espectro de variantes en el gen *CFTR* en la población ecuatoriana en el cual se analizó 48 individuos con diagnóstico sospechoso o confirmado de fibrosis quística, hallándose 70 variantes de las cuales 8 se catalogaron como patogénicas (Ver detalle Tabla 7) (Ortiz et al., 2017).

### 7.3 Resumen de Casos de pacientes con Hipotiroidismo Congénito (CH)

Debido al potencial origen oligogénico y la alta heterogeneidad de esta enfermedad se ha decidido presentar los casos de los pacientes 2, 3, 4, 5 y 6 de manera conjunta. Cabe destacar que en primera instancia no se hallaron variantes en los genes asociados a CH reportados en la literatura, por lo cual se realizó una evaluación de genes candidatos asociados con hipotiroidismo congénito como: *CDCA8*, *CHNG3*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *FOXE1*, *GLIS3*, *GNAS*, *HESX1*, *IGSF1*, *IYD*, *JAG1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *NTN1*, *PAX8*, *POU1F1*, *PROPI*, *SECISBP2*, *SLC16A2*, *SLC26A4*, *SLC5A5*, *TBX1*, *TG*, *THRA*, *THRB*, *TPO*, *TRH*, *TRHR*, *TSHB*, *TSHR*, *UBRI*, y no se encontraron variantes patogénicas ni probablemente patogénicas.

Paciente 3 de sexo femenino de 5 años de edad presenta niveles elevados de TSH (>60 mUI/L) en los resultados de Tamizaje Neonatal del Programa de Salud Pública del país. Recibe tratamiento para hipotiroidismo congénito, debido a su clínica y a los antecedentes familiares que presenta. El análisis de exoma clínico (*target sequencing*) mediante el kit *TruSight One* de Illumina, detectó 9 723 cambios respecto al genoma de referencia [GRC37.12 (HG19)]. Posteriormente, se realizó un análisis selectivo de genes relacionados con el diagnóstico o fenotipo clínico del paciente. Se detectó la variante c.4041T>G, p.Tyr1347Ter en estado heterocigoto en el gen *SCN4A* - NM\_000334.4 (Tabla 8), la cual es de tipo “*stop gained*” en la que se genera un codón de parada prematuro en la posición 401 en el exón 23 del gen *SCN4A*

dando lugar a una proteína truncada. De acuerdo a recomendaciones del ACMG esta variante es considerada como probablemente patogénica y es una nueva variante pues no ha sido reportada en bases de datos poblacionales como *ExAC* o *ClinVar*. Adicionalmente, se hallaron otras variantes de importancia detalladas en la Tabla 9, asociadas a hemocromatosis, deficiencia de 21-hidroxilasa, pancreatitis hereditaria y fibrosis quística.

En el análisis de los pacientes 4 y 5 se encontró algunas variantes en genes en común como *PRKRA* y *TTN*. Para la paciente 4 se halló variantes patogénicas en los genes *COL12A1*, *CACNA1G* y *PIEZO2*. Mientras que en el paciente 5 se hallaron variantes patogénicas en los genes *BCHE*, *EGLN1*, *NSUN2*, *TECTA*, *ATP2A2*, *SMAD9*, *SPG20* y *ELP2*.

El paciente 6, neonato de 27 días, fue un caso sospechoso, presentó índices elevados de PKU de 288.48umol/L el cual se considera normal con valores de hasta 182 umol/L. Además de varios aminoácidos aumentados inespecíficamente, incluyendo tirosina con un valor de 346umol/L cuyo rango de referencia es de 0-250 umol/. El paciente falleció a causa de estos desórdenes a los pocos días de vida. El análisis de exoma clínico (*target sequencing*) mediante el kit *TruSight One* de Illumina, detectó 9 322 cambios respecto al genoma de referencia [GRC37.12 (HG19)]. Posteriormente, se realizó un análisis selectivo de genes relacionados con el diagnóstico o fenotipo clínico del paciente. Se detectó la variante c.833T>C, p.Ile278Thr en estado heterocigoto en el gen *CBS*- NM\_001178008.1 (Ver Tabla 12). La misma aparece reportada en las bases de datos de población control *ExAC* con una frecuencia de 0.0012. Así mismo, esta variante se encuentra descrita en la base de datos *ClinVar* como Patogénica (2 estrellas). Es una variante de tipo “*missense*” en el exón 10 la cual genera un cambio de aminoácido en la posición 278 de Isoleucina a Treonina. En la Tabla 13 se detallan variantes adicionales consideradas patogénicas, destacándose aquellas asociadas a deficiencia de



ferroxidasa, tirosinemia, retardo mental, retinitis pigmentosa, síndrome de Usher y pancreatitis hereditaria.

## 8. DISCUSIÓN

En cuanto a la paciente 1 se identificaron las variantes c.518T>A, p.Ile173Asn y c.844G>T, p.Val282Leu en estado heterocigoto en el gen *CYP21A2*- NM\_000500.7 las cuales están asociadas al desorden autosómico recesivo causado por una deficiencia en la 21-hidroxilasa (El-Maouche, Arlt, & Merke, 2017; Merke & Bornstein, 2005; Simpson & Hughes, 2017), lo cual genera afección a las glándulas adrenales y en el caso de la paciente se diagnosticó el fenotipo clásico puesto que presentó virilización postnatal simple debido a una excesiva producción de andrógenos. El análisis de las variantes en bases de datos de poblaciones control como *ExAC* mostró una frecuencia de 0.00040 lo cual se consideró como un criterio para reportarla como patogénica según las recomendaciones del ACMG (Richards et al., 2015).

Fenotípicamente, la CAH se divide en la forma clásica y la no clásica, con o sin pérdida de sal y en la forma de virilización simple, la cual genera genitales ambiguos en neonatos femeninos (Fleming et al., 2017). Las variantes halladas en la paciente han sido catalogadas dentro de las nueve más frecuentes en la población mundial de acuerdo a datos de un estudio de 1 507 familias de poblaciones heterogéneas con CAH con deficiencia de la 21-hidroxilasa; en este estudio se vio que los pacientes portadores de las dos variantes *I172N* y *V281L* se asocian a los fenotipos de virilización simple y de la forma no clásica (New et al., 2013). Varios modelamientos computacionales han demostrado que la variante *I172N* en el exón 4 causa una pérdida en el *pocket* hidrofóbico de la proteína, lo cual desencadena la enfermedad de tipo virilizante, esto se ha confirmado mediante análisis de expresión *in vitro* donde se vio una

reducción de la actividad de la 21-hidroxilasa en un 2% aproximadamente (Lee, 2001; Liao, Zhang, & Gu, 2003).

Esto evidencia que la paciente pertenece al bajo porcentaje poblacional que posee la variante *I172N* en un alelo y una variante severa en el otro, en este caso es la variante *V281L* (exón 7), misma que ha reportado una frecuencia elevada en Judíos askenazis (New et al., 2013). Además, es importante considerar el tipo de variante presentada puesto que si se tuviera la variante a *DelI172N* se haría una asociación con el fenotipo de la forma no clásica. Sin embargo, la paciente padece una variante de tipo “*missense*” lo cual según los predictores bioinformáticos de patogenicidad *in silico* *SIFT*, *Polyphen2* y *Mutation taster* refiere a un efecto deletéreo, probablemente dañino y causante de enfermedad, respectivamente. Cabe destacar que la relación fenotipo-genotipo en este tipo de variantes no es perfecta, pues aunque en el 98% de los casos la variante *V281L* se asocia a la forma no clásica hay pocas excepciones en pacientes que la portan y padecen la forma clásica (Liao et al., 2003; New et al., 2013).

En cuanto a la predisposición en los géneros, se ha visto que esta variante es más predominante en mujeres que en hombres y en cuanto a la diversidad étnica de la combinación de estas variantes se vio que es más común en la población europea y que representa el 2.3% de 1 338 personas analizadas en el estudio reportado por New y colaboradores (New et al., 2013).

Otras variantes patogénicas fueron halladas en el exoma clínico de la paciente reportado en la Tabla 2 pero debido a que se clasificaron como variantes de significado incierto no se detallará profundamente a excepción de la variante *c.757G>A* en el gen *CFTR* misma que está ubicada en el exón 7 y es de tipo “*missense*” y se considera importante puesto que está relacionada con fibrosis quística y eso puede afectar en la clínica de la paciente, así como en su descendencia. También se vio que la paciente es portadora de las variantes *c.2031-2A>C* y *c.461\_462delAG*, en el gen *MPO*. En cuanto a la primera variante está asociada a deficiencia

de mieloperoxidasa entidad de herencia autosómica recesiva, la cual es de carácter congénito y tiene evidencias clínicas de ser patogénica, además refiere a una variante de tipo “*splice acceptor*” lo cual refiere a un cambio en la secuencia donde al compararla con la secuencia de referencia, se vea alterado el patrón de *splicing* del ARN, ya sea por una inserción o delección (Dunnen et al., 2016), en este caso se ha visto que la variante refiere a una inserción de 109 nucleótidos que generan un salto en el marco de lectura lo cual produce un precursor anormal de *MPO* causando fallas en la actividad enzimática (Marchetti, Patriarca, Solero, Baralle, & Romano, 2004).

Se ha visto que la mayoría de individuos que poseen la variante presentan alteraciones a nivel inmunológico y una reducción de la actividad de esta enzima en neutrófilos y monocitos, pero que es más severa en pacientes que padecen diabetes mellitus o infecciones sistémicas localizadas (Nauseef, 2014).

En cuanto a la variante c.1521\_1523delCTT, p.Phe508delPhe en estado homocigoto en el gen *CFTR*- NM\_000492.3 hallada en el paciente dos, previamente diagnosticado con fibrosis quística se conoce que es la más común en causar la enfermedad (Kerem et al., 1990). Además se conoce que esta es una enfermedad heterogénea por lo que las manifestaciones clínicas en los pacientes varían a pesar de los genotipos que presenten (Wang et al., 2017). A nivel mundial se ha referido una prevalencia de aproximadamente 60% y en un estudio reportado en la población ecuatoriana fue el 20.27%, presentando una tasa menor a la de Colombia y España (Ortiz et al., 2017).

Se ha visto una estrecha relación de la variante con patologías como la insuficiencia pancreática, presentándose en un 99% de los pacientes homocigotos y en un 36% de pacientes con otros genotipos de uno de los primeros estudios reportados en la literatura (Kerem et al., 1990; Wang, Wrennall, Cai, Li, & Sheppard, 2014). Se ha encontrado que los pacientes tienen la forma más severa de la enfermedad cuando son diagnosticados en etapas más tempranas,

mientras que los portadores de la variante presentan una forma menos severa incluyendo una función pulmonar más estable (Veit et al., 2016). Cabe destacar que se pueden presentar casos atípicos de fibrosis quística, difíciles de diagnosticar porque se manifiestan de manera tardía en la vida y se caracterizan por insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar leve (Wang et al., 2014).

Existen otros desórdenes asociados a variantes en el gen *CFTR* (Bombieri et al., 2011). Sin embargo el hallazgo de la variante c.1208C>T en el gen de *PAH* en estado heterocigoto en el paciente 2 refiere a que es portador de fenilcetonuria, debido a que esta entidad es de carácter autosómico recesivo (Blau et al., 2010) y no ha sido frecuentemente asociado a este tipo de enfermedad. Esta variante además está clasificada como patogénica con evidencia de ensayos clínicos (Blau, Hennermann, Langenbeck, & Lichter-Konecki, 2011; Scriver et al., 2000), al investigar en una de las mayores bases de datos de variantes en el gen *PAH* (BIOPKU; PAHvdb) se hallaron 18 reportes, donde se asignó un valor alélico del fenotipo (APV) de 9.1 lo cual refiere a una presentación fenotípica de hiperfenilalaninemia leve la cual se presenta en un rango de 6.7-10.0, destacándose su reporte en 11.11% de casos de fenilcetonuria en la forma clásica y leve (Wettstein et al., 2015).

En cuanto a los casos de hipotiroidismo inesperadamente no se hallaron variantes patogénicas ni probablemente patogénicas en los genes reportados en la literatura por lo que se realizó un análisis profundo de 31 genes reportados en paneles ofertados en diversos laboratorios a nivel mundial para la detección de CH. Las variantes halladas fueron de gran interés, empezando con la paciente 4 donde se encontró la variante c.404T>G, p.Tyr1347Ter en estado heterocigoto en el gen *SCN4A* - NM\_000334.4, lo interesante es que ésta no ha sido reportada hasta el momento y es de tipo “*stop gained*” lo cual refiere a que el cambio en el aminoácido genera un codón de parada, desencadenando una terminación temprana de la traducción, generando un producto de carácter proteico truncado generalmente no funcional

(Rausell et al., 2014). El gen *SNC4A*, codifica para una proteína que media la permeabilidad de las membranas excitables al ion sodio dependiente de voltaje la cual es responsable de la generación y propagación de potenciales de acción en músculos y neuronas (George, 2005). Las variantes en este gen se han asociado a diferentes patologías como Parálisis periódica hipercalémica (PPHC) (MIM170500), Parálisis periódica hipocalémica (MIM613345), Miotonía congénita atípica respondedora de acetazolamida (MIM608390) y Paramiotonía congénita (MIM168300) que corresponden a canalopatías de herencia autosómica dominante caracterizadas por miotonía y episodios de flacidez muscular generalizada asociados a diferentes niveles de potasio sérico. Los pacientes pueden tener una combinación fenotípica de

Parálisis periódica hipocalémica y Paramiotonía congénita (Weber, Jurkat-Rott, & Lehmann-Horn, 2016).

Se catalogó la variante como probablemente patogénica, puesto que es nueva y se requieren ensayos clínicos adicionales para correlacionar con el análisis de exoma clínico; además se ha reportado que la incidencia es de 0.17/100 000 (Horga et al., 2013). Debido a que la entidad es de carácter autosómico dominante, y la paciente es heterocigoto para la variante, se requiere un análisis especial enfocado a PPHC tipo 2 y a miotonía congénita.

En cuanto a las variantes encontradas en el gen *PRKRA* en los pacientes 4 y 5 se vio que son de tipo heterocigoto, y en la literatura se ha reportado que el fenotipo asociado a esta entidad es de carácter autosómico recesivo, por lo que se refiere que los pacientes son portadores, pero se requiere un análisis adicional en ambos casos para cada tipo de variante. La variante *P222L* está asociada a distonía 16, un desorden del movimiento recientemente descrito caracterizado por una distonía progresiva en los miembros, de tipo laríngeo, oromandibular y parkinsonismo, siendo su prevalencia menor a 1: 1 000 000 la cual ha sido descrita en 8 pacientes de tres familias en Brasil y una en Alemania (Camargos et al., 2008; Zech et al., 2014).

Las variantes en el gen *TTN* se encuentran asociadas a cardiomiopatías hipertróficas, entidades de carácter autosómico dominante, y se vio que los pacientes 4 y 5 son heterocigotos para la variante, esto debe analizarse, puesto que la conectina es una proteína muscular grande expresada en los músculos cardiacos y esqueléticos y desempeña un rol en el ensamblaje muscular (Itoh-Satoh et al., 2002).

Los síntomas de esta enfermedad son muy variables incluso dentro de las mismas familias; algunos individuos son asintomáticos, mientras que otros pueden sentir dolor en el pecho, problemas al respirar, palpitaciones, mareos, entre otros. Las consecuencias más graves

de la enfermedad pueden desencadenar arritmias que pueden conducir a muerte súbita (Liang et al., 2008).

En cuanto a la variante hallada en el gen *CACNA1G* cabe destacar una relación fenotípica con ataxia espinocerebelosa de tipo severo que puede desarrollar déficits en el desarrollo neurológico (Chemin et al., 2018), se debe confirmar la presencia de esta variante puesto que la herencia de la entidad es de carácter autosómico dominante y la paciente padece la variante en estado heterocigoto. Otras variantes de importancia fueron las del gen *COL12A1* asociada a una enfermedad poco común llamada miopatía de Bethlem, la cual es una miopatía benigna de carácter autosómico dominante que presenta síntomas parecidos a la distrofia muscular en su forma menos severa (Hicks et al., 2014). Finalmente, el hallazgo de la variante en el gen *PIEZO2* se asocia al Síndrome de Marden-Walker, el cual presenta contracturas múltiples en las articulaciones conocidas como artrogriposis, además se caracteriza por retardo mental, dismorfismo facial, entre otras malformaciones cerebrales, cardiovasculares y renales (McMillin et al., 2014), por lo cual se debe analizar a mayor profundidad la clínica del paciente e incluso analizar la variante por secuenciamiento de Sanger para verificar la correlación genotipo-fenotipo.

Para el paciente 5 se halló una variante en estado heterocigoto en el gen *SMAD9* en el cual se han reportado variantes asociadas a hipertensión pulmonar, entidad de carácter autosómico dominante, caracterizada por una elevada resistencia arterial pulmonar que puede desarrollar insuficiencia cardíaca, la cual es progresiva y puede ser fatal (Nasim et al., 2011); este hallazgo fue de importancia pues la madre del paciente padece la enfermedad. Otras variantes que requieren un mayor análisis son aquellas presentadas en el gen *TECTA* pues tienen una relación fenotípica con sordera, entidad de carácter autosómico dominante y el paciente padece la variante en estado heterocigoto; varios autores han referido que variantes en este gen pueden resultar en una pérdida auditiva progresiva leve, más frecuente en la

infancia (Iwasaki et al., 2002). La variante del gen *EGLN1* se presenta con el mismo patrón de heredabilidad referido con la anterior variante, pero está asociado con policitemia o eritrocitosis familiar, para lo cual sería fundamental analizar más miembros de la familia del paciente y realizar un monitoreo de los niveles de hemoglobina y hematocrito en suero sanguíneo (Percy et al., 2007).

Además se requiere un mayor análisis de las variantes en los genes *ELP2* y *NSU2* asociados a retardo mental, entidad autosómica recesiva, puesto que se vio las variantes en estado heterocigoto y se las catalogó como variantes VUS, es decir de significado incierto, y por el tipo de variante “*frameshift*” se requiere un análisis de tipo MLPA. Finalmente, la variante c.293A>G en el gen *BCHE* está asociada con una deficiencia de butirilcolinesterasa y aunque la entidad es de carácter autosómico recesivo se debe analizarla, pues en una enfermedad rara que pueden generar efectos letales en pacientes a los que se los anestesia con este relajante, pues puede desencadenar apnea postoperatoria o parálisis (Li, Duysen, Carlson, & Lockridge, 2008).

La variante c.833T>C, p.Ile278Thr en estado heterocigoto en el gen *CBS*-NM\_001178008.1 encontrada en el exoma del paciente 6 ha sido descrita como patogénica y se vio que existen otras 2 variantes en la misma posición asociadas a Homocistinuria; para esta enfermedad, se ha visto que del 95-98% de las variantes en el gen *CBS* son detectadas por secuenciación, pero dado que se han descrito grandes deleciones y duplicaciones que no son detectables por medio de esta técnica; y ya que fue encontrada una primera variante patogénica en este gen se recomienda la evaluación por MLPA del gen *CBS* con el fin de determinar la presencia de una segunda variante ya que se trata de una entidad autosómica recesiva, (Sacharow, Picker, & Levy, 2017). En cuanto a la patología se conoce es que es causada por la deficiencia de la cistationina β sintasa (CBS), caracterizada por afectación de diferentes sistemas, compromiso ocular (ectopia lentis y/o miopía), sistema esquelético (talla alta,



extremidades largas, escoliosis y pectus excavatum), sistema vascular (tromboembolismo) y sistema nervioso central (discapacidad cognitiva y retraso en el desarrollo). Uno o todos los sistemas pueden verse involucrados, la expresividad de las manifestaciones clínicas son variables. Se reconocen dos variantes fenotípicas, la Homocistinuria B6 respondedora y la B6 no respondedora; la B6 respondedora es usualmente menos severa. El screening neonatal cursa con aumento de la metionina. El tromboembolismo es la principal causa de muerte temprana y de morbilidad (Sacharow et al., 2017). En cuanto a las variantes adicionales encontradas (Tabla 13), se destaca dos presentadas en estado heterocigoto asociadas a entidades autosómicas dominantes, catalogadas como patogénicas, previamente reportadas y de tipo “*splice acceptor* y *splice donor*” las cuales generan una sustitución en el sitio de *splicing* lo cual puede causar una pérdida del exón 5 y 45 correspondientes a los genes *CUL4B* y *USH2A* estos se han

asociado a retardo mental y retinitis pigmentosa respectivamente (Isidor, Pichon, Baron, David, & Caignec, 2010).

La Tabla 15 muestra las variantes de interés halladas en el gen *PRSSI* presentadas en varios pacientes del estudio, los pacientes 1, 3 y 5 comparten la variante c.47C>T catalogada como patogénica. Los pacientes 3, 5, 6 y 8 comparten la variante patogénica c.161A>G. El paciente 2 y 6 comparten la variante patogénica c.86A>T y los pacientes 4 y 7 no presentaron variantes patogénicas. Estas variantes se correlacionan con pancreatitis crónica hereditaria, entidad de carácter autosómico dominante, destacándose que todas las variantes son de tipo heterocigoto. Esta entidad es poco común, se caracteriza por una inflamación del páncreas que va de manera progresiva a una forma crónica y suele presentarse desde los 20 años. Sus síntomas varían de dolores abdominales leves, hasta dolores crónicos que requieren de hospitalización, refiere insuficiencia pancreática exocrina generando maldigestión, intolerancia a la glucosa desarrollando diabetes mellitus tipo 1.

Además, los pacientes que la padecen tienen un riesgo de padecer cáncer de páncreas 50 veces mayor al normal e incrementa después de los 50 años (Carbonell et al., 2006); calculándose que se presenta hasta en un 40% de los pacientes que la padecen (Lowenfels et al., 1997). Se ha visto que la mayoría de los casos se deben a variantes en el gen *PRSSI* (tripsinógeno catiónico), pues es el único al que se le ha referido patogenicidad asociada a pancreatitis hereditaria, dado que las variantes en este gen alteran la inactivación prematura de tripsina catiónica (Carbonell et al., 2006). Se ha visto asociación de variantes en el gen *CFTR* con la enfermedad de tipo idiopático, esto debe ser analizado en el caso de los pacientes 1,2 y 3, en los cuales también se hallaron variantes en este gen (Chang et al., 2007).

## 9. CONCLUSIONES

A nuestro conocimiento este es el primer estudio de secuenciamiento de nueva generación asociado a desórdenes metabólicos, el cual es solo la parte inicial de un gran proyecto que pretende comprender mejor la genética del país.

El uso de tecnologías de alto rendimiento como secuenciamiento de nueva generación (NGS) brinda un beneficio en cuanto al costo-eficiencia de las técnicas en el diagnóstico de los pacientes, lo cual permite incluso salvar vidas de pacientes que se encuentren en estado crítico, y en casos sospechosos difíciles de diagnosticar por falta de evidencia clínica.

Esto también permitirá ahorrar en costos de hospitalización (Farnaes et al., 2018) al tener resultados rápidos para determinar un diagnóstico acertado y brindar tratamientos adecuados a los pacientes.

Este tipo de estudios se constituirán en una ayuda para la toma de decisiones de salud pública, puesto que mediante el análisis de exoma, se podrá esclarecer los casos de diagnóstico sospechoso, y esto permite estudiar, no solo genes de interés en los que se tiene la sospecha clínica, sino un amplio espectro relacionados a un gran número de patologías. Con este estudio se vio que el número de pacientes que tienen diagnóstico incorrecto es muy amplio, destacándose la importancia de este tipo de análisis genéticos.

Además, mediante el análisis de exomas se iniciará a la generación de bases de datos genéticas, lo cual permitirá la generación de controles poblacionales, para estudios futuros.

Finalmente, mediante el establecimiento de la línea de base genética en el país se contribuirá al desarrollo de terapias génicas, que brinden mejores oportunidades de diagnóstico y tratamiento a las generaciones futuras.

## 10. RECOMENDACIONES

Se recomienda incrementar el número de pacientes analizados por patología, para establecer una prevalencia de mutaciones asociadas a cada desorden metabólico, lo cual permitirá la generación de paneles de las variantes más comunes asociadas a cada enfermedad, y esto en consecuencia, se constituirá en la base para el desarrollo de análisis confirmatorios a costos más bajos.

En el caso de las variantes asociadas a enfermedades raras de carácter hereditario, se sugiere hacer el estudio en familiares de primer grado y consejo genético para explicar las implicaciones de los resultados encontrados.

Para las variantes candidatas detectadas mediante secuenciamiento de nueva generación se recomienda la confirmación mediante secuenciación Sanger, especialmente en caso de patologías graves y aquellas variantes que no han sido reportadas previamente en la literatura.

Se sugiere analizar aquellas variantes que han sido reportadas en la literatura como grandes deleciones, duplicaciones, secuencias repetidas largas, expansión de tripletes, entre otras; mediante técnicas como MLPA, considerando las limitaciones de la técnica de secuenciación masiva.

Además, se recomienda un análisis de correlación a profundidad del análisis de exoma y la clínica del paciente, para que los hallazgos sean de importancia significativa en el tratamiento de los pacientes y en la investigación de variantes asociadas a las diferentes patologías. Finalmente, se recomienda estudiar a profundidad las variantes en el gen *PRSSI* dado que se hallaron mutaciones en la mayoría de pacientes analizados en este estudio y ya que está asociado con una patología crónica como la pancreatitis hereditaria; se sugiere correlacionar estos hallazgos en pacientes con otro tipo de entidades relacionadas como intolerancia a la glucosa.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjum, A., Afzal, M. F., Iqbal, S. M. J., Sultan, M. A., & Hanif, A. (2014). Congenital hypothyroidism in neonates. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *18*(2), 213-216. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.129114>
- Biesecker, L. G., Burke, W., Kohane, I., Plon, S. E., & Zimmern, R. (2012). Next Generation Sequencing in the Clinic: Are we Ready? *Nature reviews. Genetics*, *13*(11), 818-824. <https://doi.org/10.1038/nrg3357>
- Blau, N., Hennermann, J. B., Langenbeck, U., & Lichter-Konecki, U. (2011). Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, *104*, S2-S9. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.017>
- Blau, N., van Spronsen, F. J., & Levy, H. L. (2010). Phenylketonuria. *The Lancet*, *376*(9750), 1417-1427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60961-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60961-0)
- Bombieri, C., Claustres, M., De Boeck, K., Derichs, N., Dodge, J., Girodon, E., ... Ferec, C. (2011). Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *Journal of Cystic Fibrosis*, *10*, S86-S102. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(11\)60014-3](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(11)60014-3)
- Borte, S., von Döbeln, U., Fasth, A., Wang, N., Janzi, M., Winiarski, J., ... Hammarstrom, L. (2012). Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*, *119*(11), 2552-2555. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371021>
- Brennan, M.-L., & Schrijver, I. (2016). Cystic Fibrosis: A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and

- Dilemmas. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(1), 3-14.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.06.010>
- Burton, B. K. (1998). Inborn Errors of Metabolism in Infancy: A Guide to Diagnosis. *Pediatrics*, 102(6), e69-e69. <https://doi.org/10.1542/peds.102.6.e69>
- Camargos, S., Scholz, S., Simón-Sánchez, J., Paisán-Ruiz, C., Lewis, P., Hernandez, D., ... Singleton, A. B. (2008). DYT16, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress-response protein PRKRA. *The Lancet. Neurology*, 7(3), 207-215. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70022-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70022-X)
- Carbonell, P., Glover, G., Fernández, J. A., Ramírez, M., Marín, C., Castellanos, G., & Parrilla, P. (2006). Pancreatitis hereditaria causada por una nueva mutación en el gen del tripsinógeno. Presentación de una familia. *Cirugía Española*, 79(4), 252-254. [https://doi.org/10.1016/S0009-739X\(06\)70863-6](https://doi.org/10.1016/S0009-739X(06)70863-6)
- Chaisomchit, S., Wichajarn, R., Chowpreecha, S., & Chareonsiriwatana, W. (2003). A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34(3), 641-645.
- Chang, M.-C., Chang, Y.-T., Wei, S.-C., Tien, Y.-W., Liang, P.-C., Jan, I.-S., ... Wong, J.-M. (2007). Spectrum of mutations and variants/haplotypes of CFTR and genotype–phenotype correlation in idiopathic chronic pancreatitis and controls in Chinese by complete analysis. *Clinical Genetics*, 71(6), 530-539. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00813.x>
- Chemin, J., Siquier-Pernet, K., Nicouleau, M., Barcia, G., Ahmad, A., Medina-Cano, D., ... Cantagrel, V. (2018). De novo mutation screening in childhood-onset cerebellar atrophy identifies gain-of-function mutations in the CACNA1G calcium channel gene. *Brain*, 141(7), 1998-2013. <https://doi.org/10.1093/brain/awy145>

- Chen, C., Huang, H., & Wu, C. H. (2017). Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1558, 3-39. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4_1)
- Cifuentes, R. A. (2016). Consideraciones bioéticas del tamizaje neonatal: pautas para su regulación integral. *Revista Latinoamericana de Bioética*, 16(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=127044052009>
- Cutting, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*, 16(1), 45-56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>
- Dunnen, J. T. den, Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., ... Taschner, P. E. M. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation*, 37(6), 564-569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- El-Maouche, D., Arlt, W., & Merke, D. P. (2017). Congenital adrenal hyperplasia. *The Lancet*, 390(10108), 2194-2210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31431-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31431-9)
- Evia, J. R. B. (2004). Tamiz neonatal. *Rev Mex Patol Clin*, 51(3), 130-144.
- Fan, X., Fu, C., Shen, Y., Li, C., Luo, S., Li, Q., ... Chen, S. (2017). Next-generation sequencing analysis of twelve known causative genes in congenital hypothyroidism. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 468, 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.02.009>
- Farnaes, L., Hildreth, A., Sweeney, N. M., Clark, M. M., Chowdhury, S., Nahas, S., ... Kingsmore, S. F. (2018). Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. *Npj Genomic Medicine*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41525-018-0049-4>
- Figuroa, D. C., & Morante, C. G. (2014). *Conocimiento de las madres sobre la prueba de tamizaje metabólico neonatal en el Centro Materno Infantil Francisco Jacome Área N°*

*11 de la Ciudad de Guayaquil en el primer trimestre del 2014a*. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Enfermería.

- Fleming, L., Riper, M. V., & Knafl, K. (2017). Management of Childhood Congenital Adrenal Hyperplasia—An Integrative Review of the Literature. *Journal of Pediatric Health Care*, *31*(5), 560-577. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2017.02.004>
- George, A. L. (2005). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(8), 1990-1999. <https://doi.org/10.1172/JCI25505>
- Gialluisi, A., Menabò, S., Baldazzi, L., Casula, L., Meloni, A., Farci, M. C., ... Romeo, G. (2018). A genetic epidemiology study of congenital adrenal hyperplasia in Italy. *Clinical Genetics*, *93*(2), 223-227. <https://doi.org/10.1111/cge.13078>
- Grasberger, H., & Refetoff, S. (2011). Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Current Opinion in Pediatrics*, *23*(4), 421-428. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32834726a4>
- Hamvas, A., Trusgnich, M., Brice, H., Baumgartner, J., Hong, Y., Noguee, L. M., & Cole, F. S. (2001). Population-Based Screening for Rare Mutations: High-Throughput DNA Extraction and Molecular Amplification from Guthrie Cards. *Pediatric Research*, *50*(5), 666-668. <https://doi.org/10.1203/00006450-200111000-00021>
- Hardelid, P., Cortina-Borja, M., Munro, A., Jones, H., Cleary, M., Champion, M. P., ... Dezateux, C. (2008). The Birth Prevalence of PKU in Populations of European, South Asian and Sub-Saharan African Ancestry Living in South East England. *Annals of Human Genetics*, *72*(1), 65-71. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2007.00389.x>
- Hayeems, R. Z., Miller, F. A., Bombard, Y., Avar, D., Carroll, J., Wilson, B., ... Axler, R. (2015). Expectations and values about expanded newborn screening: a public engagement study. *Health Expectations*, *18*(3), 419-429. <https://doi.org/10.1111/hex.12047>



- Hicks, D., Farsani, G. T., Laval, S., Collins, J., Sarkozy, A., Martoni, E., ... Straub, V. (2014). Mutations in the collagen XII gene define a new form of extracellular matrix-related myopathy. *Human Molecular Genetics*, 23(9), 2353-2363. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt637>
- Hollegaard, M. V., Grauholm, J., Nielsen, R., Grove, J., Mandrup, S., & Hougaard, D. M. (2013). Archived neonatal dried blood spot samples can be used for accurate whole genome and exome-targeted next-generation sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(1), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.06.004>
- Horga, A., Raja Rayan, D. L., Matthews, E., Sud, R., Fialho, D., Durran, S. C. M., ... Hanna, M. G. (2013). Prevalence study of genetically defined skeletal muscle channelopathies in England. *Neurology*, 80(16), 1472-1475. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828cf8d0>
- Howard, H. C., Knoppers, B. M., Cornel, M. C., Wright Clayton, E., Sénécal, K., & Borry, P. (2015). Whole-genome sequencing in newborn screening? A statement on the continued importance of targeted approaches in newborn screening programmes. *European Journal of Human Genetics*, 23(12), 1593-1600. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.289>
- Illumina. (2016). *TruSight One Sequencing Panel Kits*. [https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/trusight\\_one\\_kit.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit.html)
- Isidor, B., Pichon, O., Baron, S., David, A., & Caignec, C. L. (2010). Deletion of the CUL4B gene in a boy with mental retardation, minor facial anomalies, short stature, hypogonadism, and ataxia. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(1), 175-180. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33152>
- Itoh-Satoh, M., Hayashi, T., Nishi, H., Koga, Y., Arimura, T., Koyanagi, T., ... Kimura, A. (2002). Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications*, 291(2), 385-393.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6448>
- Iwasaki, S., Harada, D., Usami, S., Nagura, M., Takeshita, T., & Hoshino, T. (2002). Association of Clinical Features With Mutation of TECTA in a Family With Autosomal Dominant Hearing Loss. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 128(8), 913-917. <https://doi.org/10.1001/archotol.128.8.913>
- Julien, K. R. S., Jelliffe-Pawlowski, L. L., Shaw, G. M., Stevenson, D. K., O’Brodivich, H. M., & Krasnow, M. A. (2013). High Quality Genome-Wide Genotyping from Archived Dried Blood Spots without DNA Amplification. *PLOS ONE*, 8(5), e64710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064710>
- Kerem, E., Corey, M., Kerem, B., Rommens, J., Markiewicz, D., Levison, H., ... Durie, P. (1990). The Relation between Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis — Analysis of the Most Common Mutation ( $\Delta F508$ ). *New England Journal of Medicine*, 323(22), 1517-1522. <https://doi.org/10.1056/NEJM199011293232203>
- Kwan, A., Abraham, R. S., Currier, R., Brower, A., Andruszewski, K., Abbott, J. K., ... Puck, J. M. (2014). Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States. *JAMA*, 312(7), 729-738. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9132>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Riley, G. R., Jang, W., Rubinstein, W. S., Church, D. M., & Maglott, D. R. (2014). ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D980-D985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1113>
- Lee, H. H. (2001). CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Genetics*, 59(5), 293-301.

- Li, B., Duysen, E. G., Carlson, M., & Lockridge, O. (2008). The Butyrylcholinesterase Knockout Mouse as a Model for Human Butyrylcholinesterase Deficiency. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1146-1154. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.133330>
- Liang, B., Chung, F., Qu, Y., Pavlov, D., Gillis, T. E., Tikunova, S. B., ... Tibbits, G. F. (2008). Familial hypertrophic cardiomyopathy-related cardiac troponin C mutation L29Q affects Ca<sup>2+</sup> binding and myofilament contractility. *Physiological Genomics*, 33(2), 257-266. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00154.2007>
- Liao, X., Zhang, Y., & Gu, X. (2003). [CYP21 gene point mutations study in 21-hydroxylase deficiency patients]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Pediatrics*, 41(9), 670-674.
- Liu, S.-Y., Lee, C.-T., Tung, Y.-C., Chien, Y.-H., Hwu, W.-L., & Tsai, W.-Y. (2018). Clinical characteristics of Taiwanese children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal screening. *Journal of the Formosan Medical Association*, 117(2), 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.03.008>
- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., DiMagno, E. P., Elitsur, Y., Gates, L. K., Perrault, J., & Whitcomb, D. C. (1997). Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(6), 442-446.
- MacArthur, D. G., Manolio, T. A., Dimmock, D. P., Rehm, H. L., Shendure, J., Abecasis, G. R., ... Gunter, C. (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*, 508(7497), 469-476. <https://doi.org/10.1038/nature13127>
- Madariaga, J. A. (2014). De la Ley Orgánica de salud sexual y reproductiva e interrupción voluntaria del embarazo al anteproyecto de Ley Orgánica de protección de la vida del concebido y de los derechos de la mujer embarazada: buscando los porqués últimos de

- la supresión de derechos fundamentales. *Revista Vasca de Administración Pública. Herri-Arduralaritzako Euskal Aldizkaria*, (99), 465–492.
- Marchetti, C., Patriarca, P., Solero, G. P., Baralle, F. E., & Romano, M. (2004). Genetic characterization of myeloperoxidase deficiency in Italy. *Human Mutation*, 23(5), 496-505. <https://doi.org/10.1002/humu.20027>
- McMillin, M. J., Beck, A. E., Chong, J. X., Shively, K. M., Buckingham, K. J., Gildersleeve, H. I. S., ... Bamshad, M. J. (2014). Mutations in PIEZO2 Cause Gordon Syndrome, Marden-Walker Syndrome, and Distal Arthrogyriposis Type 5. *The American Journal of Human Genetics*, 94(5), 734-744. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.015>
- Merke, D. P., & Bornstein, S. R. (2005). Congenital adrenal hyperplasia. *The Lancet*, 365(9477), 2125-2136. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66736-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66736-0)
- Ministerio de Salud Pública. (2017). Proyecto de Tamizaje Metabólico Neonatal – Ministerio de Salud Pública. Recuperado 19 de octubre de 2017, de <http://www.salud.gob.ec/proyecto-de-tamizaje-metabolico-neonatal/>
- Morales López, T. G. (2011). *Propuesta de un modelo de programa nacional de pesquisa neonatal para errores innatos del metabolismo como una estrategia de Salud Pública para la prevención de discapacidades*. (B.S. thesis). Quito, 2011.
- Nasim, M. T., Ogo, T., Ahmed, M., Randall, R., Chowdhury, H. M., Snape, K. M., ... Machado, R. D. (2011). Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Human Mutation*, 32(12), 1385-1389. <https://doi.org/10.1002/humu.21605>
- Nauseef, W. M. (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular Microbiology*, 16(8), 1146-1155. <https://doi.org/10.1111/cmi.12312>
- New, M. I., Abraham, M., Gonzalez, B., Domic, M., Razzaghy-Azar, M., Chitayat, D., ... Yuen, T. (2013). Genotype–phenotype correlation in 1,507 families with congenital

- adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2611-2616.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1300057110>
- Ortiz Rubio, A. C., & Villacis Guerrero, B. E. (2015). *Evaluación del desempeño del programa nacional de tamizaje metabólico neonatal del Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el período comprendido desde enero a noviembre del 2014* (Master's Thesis). PUCE.
- Ortiz, S. C., Aguirre, S. J., Flores, S., Maldonado, C., Mejía, J., & Salinas, L. (2017). Spectrum of CFTR gene mutations in Ecuadorian cystic fibrosis patients: the second report of the p.H609R mutation. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 5(6), 751-757.  
<https://doi.org/10.1002/mgg3.337>
- Pandor, A., Eastham, J., Beverley, C., Chilcott, J., & Paisley, S. (2004). Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review.
- Park, S. M. (2005). Genetics of congenital hypothyroidism. *Journal of Medical Genetics*, 42(5), 379-389. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024158>
- Parsa, A. A., & New, M. I. (2017). Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 165, 2-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.015>
- Pediatrics, A. A. of, Rose, S. R., Association, A. T., Brown, R. S., & Society, L. W. P. E. (2006). Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism. *Pediatrics*, 117(6), 2290-2303. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-0915>
- Percy, M. J., Furlow, P. W., Beer, P. A., Lappin, T. R. J., McMullin, M. F., & Lee, F. S. (2007). A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF

- binding groove. *Blood*, *110*(6), 2193-2196. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-084434>
- Porta, F., Pagliardini, S., Pagliardini, V., Ponzone, A., & Spada, M. (2015). Newborn screening for galactosemia: a 30-year single center experience. *World Journal of Pediatrics*, *11*(2), 160-164. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0017-3>
- Quon, B. S., & Rowe, S. M. (2016). New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ*, *352*, i859. <https://doi.org/10.1136/bmj.i859>
- Rausell, A., Mohammadi, P., McLaren, P. J., Bartha, I., Xenarios, I., Fellay, J., & Telenti, A. (2014). Analysis of Stop-Gain and Frameshift Variants in Human Innate Immunity Genes. *PLoS Computational Biology*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003757>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). 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. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(5), 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rodrigues, C., Jorge, P., Soares, J. P., Santos, I., Salomão, R., Madeira, M., ... Santos, R. (2005). Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology*, *152*(2), 193-198. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01826>
- Sacharow, S. J., Picker, J. D., & Levy, H. L. (2017). Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. En M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*®. Seattle (WA):

University of Washington, Seattle. Recuperado de  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1524/>

- Saudubray, J.-M., Sedel, F., & Walter, J. H. (2006). Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2-3), 261-274. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0358-0>
- Scriver, C. R., Waters, P. J., Sarkissian, C., Ryan, S., Prevost, L., Côté, D., ... Nowacki, P. M. (2000). PAHdb: a locus-specific knowledgebase. *Human Mutation*, 15(1), 99-104. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<99::AID-HUMU18>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<99::AID-HUMU18>3.0.CO;2-P)
- Simpson, H., & Hughes, I. (2017). Congenital adrenal hyperplasia. *Medicine*, 45(8), 502-505. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.05.012>
- Taber, K. A. J., Dickinson, B. D., & Wilson, M. (2014). The Promise and Challenges of Next-Generation Genome Sequencing for Clinical Care. *JAMA Internal Medicine*, 174(2), 275-280. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.12048>
- Therrell, B. L., Johnson, A., & Williams, D. (2006). Status of Newborn Screening Programs in the United States. *Pediatrics*, 117(Supplement 3), S212-S252. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2633C>
- van Engelen, K., Mommersteeg, M. T. M., Baars, M. J. H., Lam, J., Ilgun, A., van Trotsenburg, A. S. P., ... Postma, A. V. (2012). The ambiguous role of NKX2-5 mutations in thyroid dysgenesis. *PloS One*, 7(12), e52685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052685>
- Veit, G., Avramescu, R. G., Chiang, A. N., Houck, S. A., Cai, Z., Peters, K. W., ... Drubin, D. G. (2016). From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Molecular Biology of the Cell*, 27(3), 424-433. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0935>

- Viggiano, E., Marabotti, A., Burlina, A. P., Cazzorla, C., D'Apice, M. R., Giordano, L., ... Burlina, A. B. (2015). Clinical and molecular spectra in galactosemic patients from neonatal screening in northeastern Italy: Structural and functional characterization of new variations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene. *Gene*, 559(2), 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.013>
- Wang, F., Liu, C., Jia, X., Liu, X., Xu, Y., Yan, S., ... Gu, M. (2017). Next-generation sequencing of NKX2.1, FOXE1, PAX8, NKX2.5, and TSHR in 100 Chinese patients with congenital hypothyroidism and athyreosis. *Clinica Chimica Acta*, 470, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.04.020>
- Wang, Y., Wrennall, J. A., Cai, Z., Li, H., & Sheppard, D. N. (2014). Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 52, 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.04.001>
- Weber, F., Jurkat-Rott, K., & Lehmann-Horn, F. (2016). Hyperkalemic Periodic Paralysis. En M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1496/>
- Welling, L., Boelen, A., Derks, T. G. J., Schielen, P. C. J. I., de Vries, M., Williams, M., ... Bosch, A. M. (2017). Nine years of newborn screening for classical galactosemia in the Netherlands: Effectiveness of screening methods, and identification of patients with previously unreported phenotypes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(3), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.012>
- Wettstein, S., Underhaug, J., Perez, B., Marsden, B. D., Yue, W. W., Martinez, A., & Blau, N. (2015). Linking genotypes database with locus-specific database and genotype-



phenotype correlation in phenylketonuria. *European Journal of Human Genetics*, 23(3), 302-309. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.114>

Zech, M., Castrop, F., Schormair, B., Jochim, A., Wieland, T., Gross, N., ... Winkelmann, J. (2014). DYT16 revisited: exome sequencing identifies PRKRA mutations in a European dystonia family. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 29(12), 1504-1510. <https://doi.org/10.1002/mds.25981>

## 12.ANEXOS

### Anexo 1. Principales variantes puntuales de las enfermedades analizadas por el Tamizaje Neonatal en Ecuador

*Ilustración 1. SNPs asociados al hipotiroidismo congénito*

db SNP	Consequence	Score	PMIDs
rs121908866	Stop gained	0.503	6
rs121908085	Missense variant	0.5	6
rs121908872	Missense variant	0.5	6
rs2076739	Missense variant	0.006	2
rs4774518	Synonymous variant	0.006	2
rs2076738	Missense variant	0.006	2
rs746165975	Frameshift variant	0.003	1
rs746701654	Missense variant	0.003	1
rs766399662	Frameshift variant	0.003	1
rs45499704	Missense variant	0.003	1

**Fuente:** Integrative Biomedical Informatics Group, 2017

*Ilustración 2. SNPs asociados a fenilcetonuria*

db SNP	Consequence	Score	PMIDs
rs5030858	Missense variant	0.55	32
rs5030849	Missense variant	0.516	15
rs75193786	Missense variant	0.513	14
rs5030847	Missense variant	0.513	24
rs62514952	Stop gained	0.513	6
rs5030859	Missense variant	0.509	5
rs62516101	Missense variant	0.509	20
rs5030841	Missense variant	0.509	5
rs76296470	Stop gained	0.506	19
rs74603784	Missense variant	0.506	2

**Fuente:** Integrative Biomedical Informatics Group, 2017

*Ilustración 3. SNPs asociados a galactosemia*

<b>db SNP</b>	<b>Consequence</b>	<b>Score</b>	<b>PMIDs</b>
rs2070074	Missense variant	0.528	21
rs111033792	Missense variant	0.5	9
rs111033690	Missense variant	0.022	7
rs75391579	Missense variant	0.009	3
rs121908047	Missense variant	0.009	3
rs111033773	Missense variant	0.006	2
rs368637540	Missense variant	0.003	1
rs28940884	Missense variant	0.003	1
rs28940882	Missense variant	0.003	1
rs3180383	Missense variant	0.003	1

**Fuente:** Integrative Biomedical Informatics Group, 2017

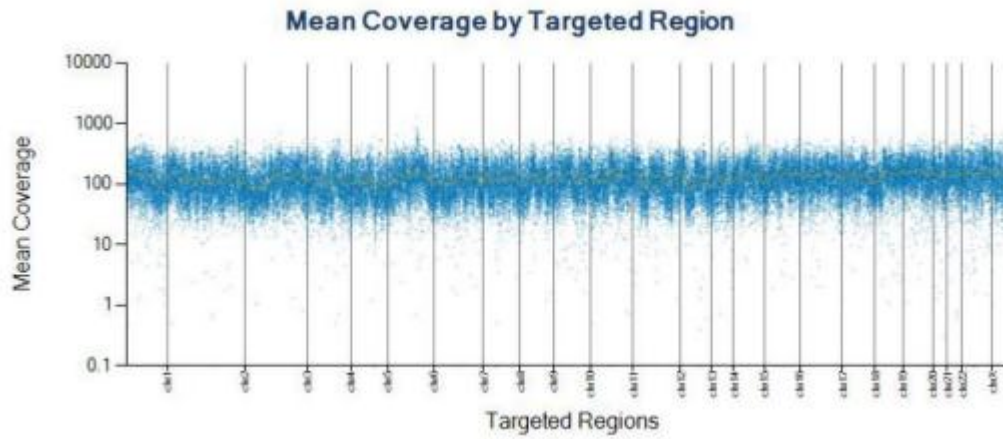
*Ilustración 4. SNPs asociados a hiperplasia suprarrenal*

<b>db SNP</b>	<b>Consequence</b>	<b>Score</b>	<b>PMIDs</b>
rs104894070	Missense variant	0.503	1
rs193922540	Missense variant	0.5	0
rs104894069	Missense variant	0.5	1
rs61752786	Missense variant	0.5	0
rs556794126	Frameshift variant	0.5	3
rs193922538	Missense variant	0.5	0
rs193922539	Missense variant	0.5	1
rs193922541	Splice donor variant	0.5	0
rs9378251	Missense variant	0.006	2
rs7755898	Stop gained	0.006	1

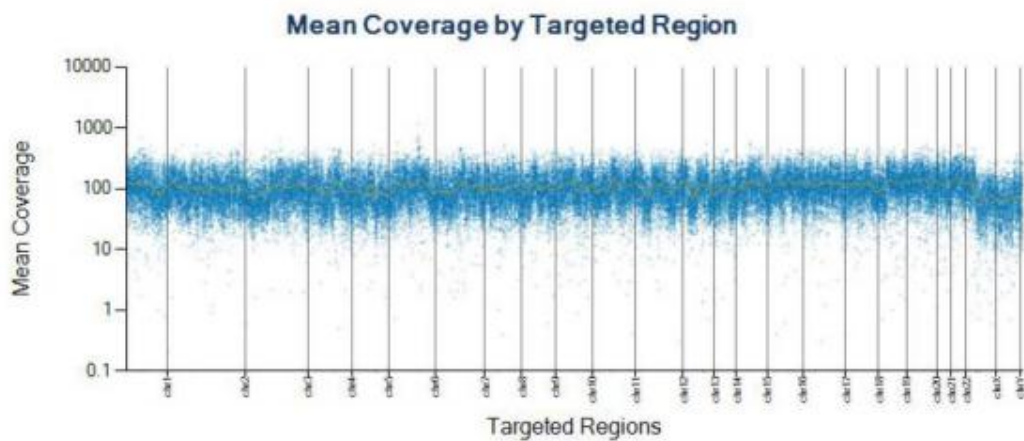
**Fuente:** Integrative Biomedical Informatics Group, 2017

**Anexo 2. Gráficas de coberturas obtenidas mediante el secuenciamiento de nueva generación para las enfermedades analizadas**

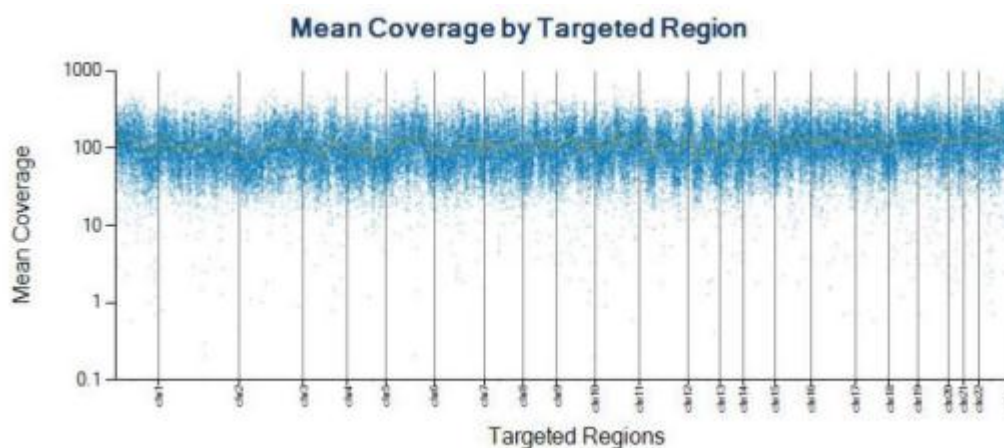
*Ilustración 5. Cobertura Promedio por región de interés para pacientes con Hiperplasia Suprarrenal congénita*



*Ilustración 6. Cobertura Promedio por región de interés para pacientes con Fibrosis Quística*



**Ilustración 7. Cobertura Promedio por región de interés para pacientes con CH.**



**Anexo 3. Variantes encontradas en los diferentes casos positivos asociados a las diferentes patologías**

**Tabla 1. Variantes encontradas en el análisis de exoma para pacientes con Hiperplasia Suprarrenal congénita**

Gen	Variante	Proteína	Id. SNV	Cigalidad	Profundidad	Clasificación	Patología asociada
<i>CYP21A2</i>	c.518T>A	p.Ile173Asn	rs6475	Het.	69X	Patogénica	Hiperplasia suprarrenal congénita
<i>CYP21A2</i>	c.844G>T	p.Val282Leu	rs6471	Het.	116X	Patogénica	

**Tabla 2. Variantes adicionales encontradas en el análisis de exoma para pacientes con Hiperplasia Suprarrenal congénita**

Gen	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Variante	Cigalidad	Transcrito	Clasificación	Patología asociada	Frecuencia ExAC
<i>CRYGD</i>	c.168C>G	p.Tyr56Ter	rs202233735	Stop gained, Exon 2/3	Het.	NM_006891.3	VUS	Cataratas 4, AD (MIM115700)	0.032988 (AMR)
<i>PRSS1</i>	c.47C>T	p.Ala16Val	rs202003805	Missense Exon 2/5	Het.	NM_002769.4	VUS	Pancreatitis Hereditaria, AD (MIM167800)	0.047875 (AFR)

<i>SLC4A1</i>	c.2561C>T	p.Pro854 Leu	rs2285644	Missense Exon 19/20	Het.	NM_000342.3	VUS	Esferocitosis 4, anemia hemolítica, AD. (OMIM109270)	0.051873 (1000 genomas)
<i>MPO</i>	c.2031-2A>C	—	rs35897051	Splice acceptor	Het.	NM_000250.1	Patogénica	Deficiencia de Mieloperoxidasa, AR	0.0043
<i>CFTR</i>	c.757G>A	p.Gly253 Arg	—	Missense Exon 7/27	Het.	NM_000492.3	VUS	Fibrosis Quística, AR (MIM219700)	0.00003199 (1 en Latino)
<i>PQBPI</i>	c.461_462delAG	p.Glu154 Alafs*12	rs606231195	Frameshift Exon 5/7	Hom	NM_001032383.1	Patogénica (1 sometimiento)	RENPEÑING SYNDROME 1 (MIM309500)*	

**Tabla 3. Resumen de Coberturas para pacientes con Hiperplasia Suprarrenal congénita**

Mean Region Coverage Depth	Uniformity of Coverage	Target Coverage at 1X	Target Coverage at 10X	Target Coverage at 20X	Target Coverage at 50X
143.9X	93.4%	99.2%	98.1%	96.2%	83.8%

**Tabla 4. Variantes encontradas en el análisis de exoma para pacientes con Fibrosis Quística**

Gen	Variante	Proteína	Id. SNV	Cigotidad	Profundidad	Clasificación	Patología asociada
<i>CFTR</i>	c.1521_1523delCTT	p.Phe508 delPhe	rs113993960	Hom	61X	Patogénica	Fibrosis Quística

**Tabla 5. Resumen de Coberturas para pacientes con Fibrosis Quística**

Mean Region Coverage Depth	Uniformity of Coverage	Target Coverage at 1X	Target Coverage at 10X	Target Coverage at 20X	Target Coverage at 50X
118.8X	93.5%	99.6%	98.1%	95.1%	78.4%

**Tabla 6. Variantes adicionales encontradas en el análisis de exoma para pacientes con Fibrosis Quística**

Gen	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Tipo de Variante	Cigoidad	Transcrito	Clasificación	Patología asociada	Frecuencia ExAC
<i>PAH</i>	c.1208 C>T	p.Ala403 Val	rs5030857	Missense Exon 12/13	Het.	NM_000277.1	Patogénica	Fenilcetonuria, AR (MIM261600)	0.00054
<i>RNAS EH2B</i>	c.529G>A	p.Ala177 Thr	rs75184679	Missense Exon 7/11	Het.	NM_024570.3	Patogénica	Aicardi Goutieres síndrome 2, AR (MIM610181)	0.0013
<i>ATP7B</i>	c.4301 C>T	p.Thr1434Met	rs60986317	Missense Exon 21/21	Het.	NM_000053.3	VUS	Enfermedad de Wilson, AR (MIM277900)	0.00190

**Tabla 7. Variantes patogénicas halladas en el gen *CFTR* en la población ecuatoriana.**

Mutación	Prevalencia IC (95%)	Prevalencia	País	P-value
<i>p.F508del</i>	20.27	37.1	Ecuador (Valle et al. 2007)	P<0.05
		41.8	Colombia (Keyeux et al. 2003)	P<0.05
		25	Perú (Silva 2008)	P>0.05
		30.6	Chile (Lay et al. 2011)	P>0.05
		40.7	México (Orozco et al. 2000)	P<0.05
		52.7	España (Bobadilla et al. 2002)	P<0.05
<i>p.H609R</i>	18.92		Ecuador (Valle et al. 2007)	P>0.05
<i>p.G85E</i>	8.11	8.9	Chile (Lay et al. 2011)	P<0.05
		0.5	México (Orozco et al. 2000)	P<0.05
		0.5	España (Bobadilla et al. 2002)	P<0.05
		0.8		
<i>p.G970S</i>	4.05			
<i>p.W1098X</i>	2.70			
<i>p.R1162X</i>	1.35	1.1	Colombia (Keyeux et al. 2003)	P>0.05
<i>p.N1303K</i>	1.35	0.9	Chile (Lay et al. 2011)	P>0.05
		1.6	España (Bobadilla et al. 2002)	P>0.05
		2.4	Ecuador (Valle et al. 2007)	P>0.05
		0.5	Colombia (Keyeux et al. 2003)	P>0.05
		2.1	México (Orozco et al. 2000)	P>0.05
		2.5		

			España (Bobadilla et al. 2002)	
<i>p.G330E</i>	2.70			
<i>p.A455E</i>	1.35	8.3	Canadá (De Braeckleer 1997)	P<0.05

Fuente: (Ortiz et al., 2017)

**Tabla 8. Variantes encontradas en el análisis de exoma para paciente 3 con Hipotiroidismo congénito**

Gen	Variante	Proteína	Id. SNV	Cigoidad	Profundidad	Clasificación	Patología asociada
<i>SCN4A</i>	c.4041T>G	p.Tyr1347Ter	-----	Het	77X	Prob. Patogénica	Parálisis hipercalémica periódica (MIM170500)

**Tabla 9. Variantes adicionales encontradas en el análisis de exoma para paciente 3 con Hipotiroidismo congénito**

Gen	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Tipo de Variante	Cigoidad	Transcrito	Clasificación ClinVar	Patología asociada	Frecuencia ExAC
<i>HFE</i>	c.845G>A	Cys282 Tyr	rs1800562	Missense Exon 4/6	Het.	NM_000410.3	Prob. Patogénica (13)	Hemocromatosis tipo 1, AR	0.0324
<i>CYP21A2</i>	c.955C>T	Gln319 Ter	rs7755898	Stop gained Exon 8/10	Het.	NM_000500.7	Patogénica (5) dos estrellas	21-hydroxylase deficiency, AR	-----
<i>PRSS1</i>	c.47C>T	Ala16 Val	rs202003805	Missense Exon: 2/5	Het. 18x (3 alter)	NM_002769.4	Patogénica (4) VUS (2), 1 estrella	Pancreatitis hereditaria, AD	0.016
<i>PRSS1</i>	c.161A>G	Asn54 Ser	rs144422014	Missense Exon: 2/5	Het. 17x (8 alter)	NM_002769.4	Patogénica (1) (2005)	Pancreatitis hereditaria, AD	0.035
<i>CFTR</i>	c.4333G>A	Asp1445Asn	rs148783445	Missense Exon: 27/27	Het.	NM_000492.3	VUS (5)	Fibrosis quística, AR	0.0005



**Tabla 10. Variantes encontradas en el análisis de exoma para paciente 4 con Hipotiroidismo congénito**

Gen	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Tipo de Variante	Cigosi dad	Transcrito	Clasificación	Patología asociada	Frecuencia ExAC
<i>GJB2</i>	c.101T>C	p.Met34Thr	rs35887622	Missense Exon 2/2	Het.	NM_004004.5	VUS Benign(1);Likely benign(5);Likely pathogenic(2); <b>Pathogenic(11);</b> Uncertain significance(4)	Sordera y Ceguera (Ver tabla) Deafness, autosomal recessive 1 (+somet. Patogenicos)	0.0085  SIFT: Deleterious MutationTaster: disease causing
<i>TUBB2B</i>	c.743C>T	p.Ala248Val	rs777598117	Missense Exon 4	Het.	NM_178012.4	Prob. Patogénica (1) 2017, 1 estrella	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 7 (MIM612850), <b>AD</b>	SIFT: Deleterious MutationTaster: disease causing
<i>GATA4</i>	c.617-64G>C	—	rs10503425	Intronica Exon 3, <b>Off target</b>	Het.	NM_002052.4	Patogénica (1) 2017, 0 estrellas	Congenital heart disease, <b>AD</b> (MIM600576)	

**Tabla 11. Variantes encontradas en el análisis de exoma para paciente 5 con Hipotiroidismo congénito**

Gen	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Tipo de Variante	Cigosi dad	Transcrito	Clasificación	Patología asociada	Frecuencia ExAC
<i>ASPM</i>	c.349C>T	p.Arg117*	rs137852996	Non sense Exon 2	<b>Het</b>	NM_018136.4	Patogénica (2)	Primary autosomal recessive microcephaly 5	0.00003
<i>BCHE</i>	c.293A>G	p.Asp98Gly	rs1799807	Missense Exon 2	Het.	NM_000055.2	Prob. Patogénica	Deficiency of butyrylcholine esterase, AR (MIM617936)	0.01207
<i>NSUN2</i>	c.660delC	p.Cys221AlafsTer11	—	Frameshift Indels Exon 7/19	Het.	NM_017755.5	Prob. Pato VUS	Mental retardation, autosomal recessive 5	—

<i>RBM8A</i>	c.-21G>A	— —	rs139428292	5'UTR Exon 1 <b>Off target</b>	Het.	NM_005105.4	Patogénica (9), dos estrellas	Radial aplasia-thrombocytopenia síndrome, AR (MIM274000)	0.02368
--------------	----------	--------	-------------	-----------------------------------	------	-------------	-------------------------------	--	---------

**Tabla 12. Variantes encontradas en el análisis de exoma para paciente 6 (caso sospechoso)**

Gen	Variante	Proteína	Id. SNV	Cigoidad	Profundidad	Clasificación	Patología asociada
<i>CBS</i>	c.833T>C	p.Ile278Thr r	rs5742905	Het	107X	Patogénica	Homocistinuria

**Tabla 13. Variantes adicionales encontradas en el análisis de exoma para paciente 6 (caso sospechoso)**

Gen	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Tipo de Variante	Cigoidad	Transcrito	Clasificación ClinVar	Patología asociada	Frecuencia ExAC
<i>CP</i>	c.643C>T	p.Arg215Ter	rs386134155	Stop gained Exon4/19	Het.	NM_000096.3	Patogénica (1)	Deficiency of ferroxidase, AR	—
<i>FAH</i>	c.243G>A	p.Ala81=	rs36122289	Sinónima Exón 3/14	Het.	NM_000137.2	<b>VUS</b> Likely benign(1);Uncertain significance(2) 2017	Tirosinemia, AR	0.0003
<i>CULAB</i>	c.727-1G>A	—	—	Splice acceptor Exón 5	<b>Het. (12X)</b>	NM_003588.3	Patogénica (Varsome)	Mental retardation, X-linked, syndromic 15 (Cabezas type)	Splice site substitution. This substitution is located in the acceptor splice site of intron 4. The consequence of this change

									is not predictable, but a skip of exon 5 is very likely.
<i>USH2A</i>	c.9055+1G>T	————	————	Splice donor Exon 45	Het. (13X)	NM_206933.2	Patogénica (Varsome)	Retinitis pigmentosa 39, AR Usher syndrome, type 2A, AR	Splice site substitution. This substitution is located in the donor splice site of intron 45. The consequence of this change is not predictable, but a skip of exon 45 is very likely.
<i>PRSSI</i>	c.161A>G	p.Asn54Ser	rs144422014	Missense Exon 2/5	Het.	NM_002769.4	Patogénica (1)	Pancreatitis Hereditaria, AD	0.0354
<i>CBS</i>	c.833T>C	p.Ile278Thr	rs5742905	Missense Exon 10/17	Het.	NM_001178008.1	Patogénica (10) dos estrellas.	Homocystinuria due to CBS deficiency, AR	0.0012
<i>MTR</i>	c.2050G>T	p.Glu684Ter	————	Stop gained Exon 20/33	Het.	NM_000254.2	Prob. Patogénica (NO CLINVAR)	Homocystinuria -megaloblastic anemia, cblG complementation type, AR.	————

Tabla 14. Resumen de Coberturas para pacientes con Hipotiroidismo Congénito

Mean Region Coverage Depth	Uniformity of Coverage	Target Coverage at 1X	Target Coverage at 10X	Target Coverage at 20X	Target Coverage at 50X
128X	93.7%	99.4%	98.0%	95.8%	81.4%

Tabla 15. Variantes encontradas en el gen PRSSI en varios pacientes del estudio

Paciente	c.ADN	Proteína	Id. SNV	Tipo de Variante	Cigosi dad	Profundid ad	Transcrit o	Clasificación ClinVar	Frecu encia ExAC
1	c.47C>T	Ala16 Val	rs20200 3805	Missense Exon: 2/5	Het.	24X	NM_0027 69.4	Pathogenic (4);Uncertain significance (2)	0.0160 4
2	c.86A>T	Asn29 Ile	rs11103 3566	Missense Exon: 2/5	Het.	30x	NM_0027 69.4	Patogénica (7) dos estrellas	0.4751 1
4	<b>Este paciente no presentó variantes patogénicas</b>								
3	c.47C>T	Ala16 Val	rs20200 3805	Missense Exon: 2/5	Het. (3 alter)	18x	NM_0027 69.4	Pathogenic (4);Uncertain significance (2)	0.0160 4
3	c.161A>G	Asn54 Ser	rs14442 2014	Missense Exon: 2/5	Het.	10x	NM_0027 69.4	Pathogenic (1)	0.0354 4
5	c.47C>T	Ala16 Val	rs20200 3805	Missense Exon: 2/5	Het. (3 alter)	14x	NM_0027 69.4	Pathogenic (4);Uncertain significance (2)	0.0160 4
5	c.161A>G	Asn54 Ser	rs14442 2014	Missense Exon: 2/5	Het.	17x	NM_0027 69.4	Pathogenic (1)	0.0354 4
7	<b>Este paciente no presentó variantes patogénicas</b>								
6	c.161A>G	Asn54 Ser	rs14442 2014	Missense Exon: 2/5	Het.	16x	NM_0027 69.4	Pathogenic (1)	0.0354 4
6	c.86A>T	Asn29 Ile	rs11103 3566	Missense Exon: 2/5	Het.	20x	NM_0027 69.4	Patogénica (7) dos estrellas	0.4751 1
8	c.161A>G	Asn54 Ser	rs14442 2014	Missense Exon: 2/5	Het.	15x	NM_0027 69.4	Pathogenic (1)	0.0354 4