



**MEDICINA GENÓMICA EN EL DIAGNÓSTICO DE
ENFERMEDADES RARAS**

Trabajo de grado para optar al título de

Magíster en Genética Humana

Erika Marcela Jiménez Rojas, MD

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Maestría en Genética Humana

Bogotá, DC, noviembre 2022

**MEDICINA GENÓMICA EN EL DIAGNÓSTICO DE
ENFERMEDADES RARAS**

Trabajo de grado para optar al título de

Magíster en Genética Humana

Erika Marcela Jiménez Rojas, MD

Director tesis: Carlos Martín Restrepo PhD

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Maestría en Genética Humana

Bogotá, DC, noviembre de 2022

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

**MEDICINA GENÓMICA EN EL DIAGNÓSTICO DE
ENFERMEDADES RARAS**

Erika Marcela Jiménez Rojas, MD

Arobado

Director tesis:

Carlos Martín Restrepo PhD

DEDICATORIA

Con el corazón lleno de felicidad y orgullo, dedico este trabajo de grado a mi maravillosa familia, quienes siempre creyeron en mí y estuvieron conmigo luchando hombro a hombro para alcanzar esta meta. Ellos que como pilares me sostuvieron y no me dejaron flaquear ante el cansancio o las adversidades, siempre dándome lo mejor de sí mismos para ayudarme a llegar a este momento, en el que escribo las últimas páginas de este capítulo de mi vida, llamado Maestría en Genética Humana, que ha sido más largo de lo que yo había pensado, pero que hoy lo concluyo con gratitud y sobre todo con la satisfacción del deber cumplido y el trabajo bien hecho.

Este trabajo va dedicado también a todos esos ángeles terrenales que Dios dispuso en mi camino a lo largo de estos años en la Universidad el Rosario y en Genética Molecular de Colombia, para ayudarme a materializar este sueño y ser un aporte invaluable en mi crecimiento personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

“Siempre hay que encontrar el tiempo para agradecer a las personas que hacen la diferencia en nuestra vida” J F Kennedy

Agradezco a Dios, quien dispuso todo a mi favor para poder cumplir este sueño y fue luz en este largo camino de subidas y bajadas. A mis padres, esposo, hijo y hermanos por su amor desmedido, el apoyo constante que me han brindado siempre y sobre todo por su paciencia infinita, gracias por apostarle a este sueño en familia y ser el combustible inagotable para cumplirlo.

Un agradecimiento especial al Dr. Carlos Martin Restrepo por su valiosa orientación, soporte y discusión crítica que permitieron que esta tesis llegara a buen término.

A la Dra. Dora Fonseca por su apoyo y acompañamiento constante durante mi proceso académico, al igual que a los demás investigadores del grupo CIGGUR, por su invaluable ayuda a lo largo de la ejecución de mi trabajo de tesis.

También quiero extender mi gratitud hacia Genética Molecular de Colombia, en donde me hicieron sentir como en casa y siempre estuvieron prestos a ayudarme.

Contenido

Introducción	16
Formulación del Problema	17
Planteamiento del Problema.....	17
Justificación	19
Pregunta de Investigación	21
Objetivos	22
Objetivo General	22
Objetivos Específicos.....	22
Antecedentes Generales	23
Enfermedades Raras	23
Enfermedades Raras en Colombia	26
Capítulo I Mal Diagnóstico para una Enfermedad de Depósito Lisosomal.....	29
Presentación de Casos clínicos	45
Caso 1	45

Información clínica:.....	45
Caso 2	46
Información clínica:.....	46
Estudios Moleculares	49
Análisis molecular del gen Hexosaminidasa B (<i>HEXB</i>)	49
Metodología.....	49
Análisis de los productos de secuenciación de Sanger de <i>HEXB</i>	51
Estudio de ADN mediante secuenciación de siguiente generación - exoma de diagnóstico y panel comprensivo para enfermedades lisosomales.....	52
Metodología.....	52
Secuenciación de exoma completo y detección de variantes	52
Análisis de variantes y generación del reporte	52
Medición de actividad enzimática de hexosaminidasa y alfa galactosidasa	53
Metodología.....	53
Resultados	53
Variante AP3B1 NP_003655.3 p.Val999Met	56

Variante GLA NP_000160.1 p.Gly375Ala	57
Variante HEXB NM_000521.3 c.300-18_300-2del.....	58
Variante HPS5 NP_852608.1 p.Pro846Leu	58
Variante MAN2B1 NP_000519.2 p.Pro282Ser	59
Discusión.....	61
Capítulo II. La Identificación de un Fenotipo Intermedio y Penetrancia Incompleta para una Enfermedad Neurológica Rara.....	68
Presentación de Casos Clínicos	77
Caso 1	77
Caso 2	78
Caso 3	79
Caso 4	79
Caso 5	79
Caso 6	80
Caso 7	80
Caso 8	80

	10
Caso 9	80
Caso 10.....	81
Caso 11.....	81
Estudios Moleculares	83
Estudio de exoma dirigido para enfermedad neurodegenerativa	83
Metodología.....	83
Análisis molecular del gen <i>C19orf12</i>	84
Metodología.....	84
Resultados	84
Discusión.....	91
Capítulo III. Enfermedades Raras No Diagnosticadas.....	98
Presentacion de Caso Clínico.....	101
Estudios Moleculares: Estudio de ADN Mediante Secuenciación de Siguiete Generación, Exoma de Diagnóstico y Panel Comprensivo para Trimenilaminuria y Genes Relacionados	
102	
Metodología.....	102

Toma de Muestras de Laboratorio para Valoración de Función Hepática, Renal y Niveles De Cpk	103
Metodología:.....	103
Resultados	104
Variante FMO3 p.Asp132His NP_001002294.1:	104
Discusión.....	105
Conclusiones Generales	107
Referencias.....	108
Anexo Capítulo I.....	119
Anexo Caso 2.....	131

Lista de Tablas

Tabla 1.	Clasificación de las enfermedades lisosomales	31
Tabla 2.	Características y diagnóstico de la enfermedad de Niemann Pick	36
Tabla 3.	Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Sandhoff según su edad de presentación.....	39
Tabla 4.	Compromiso multisistémico y manifestaciones clínicas de la EF	42
Tabla 5.	Condiciones de estandarización de PCR para el ORF de HEXB	50
Tabla 6.	Variantes encontradas en secuenciación de exoma	55
Tabla 7.	Resultados actividad enzimática.....	60
Tabla 8.	Genes NBIA asociados a una patología y su fenotipo	69
Tabla 9.	Condición y primers exón 3 gen C19orf12	84
Tabla 10.	Manifestaciones clínicas de grupo familiar con NBIA	85
Tabla 11.	Identificación de variante y análisis bioinformático secuenciación de Sanger	88
Tabla 12.	Identificación de variante y análisis bioinformático secuenciación de exoma...	104

Tabla 13.	Reportes de función, renal, hepática y niveles de creatina kinasa total	105
-----------	---	-----

Lista de Figuras

Figura 1.	Vías de digestión lisosomal	30
Figura 2.	Foto de la niña del caso número 2, autorizada por el defensor de Familia del ICBF.....	47
Figura 3.	Electroferograma que indica la presencia de las variantes genéticas heterocigotas en 5´UTR c.-122delC y c.-126 C<T	54
Figura 4.	Electroferograma que indica la presencia de la variante genética en el iintrón 1: c- 300-18_300-2del.....	54
Figura 5.	Árbol genealógico de hermanos con mutaciones heterocigotas	61
Figura 6.	RNM de cerebro paciente caso índice con imágenes en los ganglios basales, que corresponden a depósitos de hierro	78
Figura 7.	. Foto de paciente caso índice,	78
Figura 8.	Genealogía familia afectada NBIA	82
Figura 9.	Caso 1. Variante homocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	88
Figura 10.	Caso 2 Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	89
Figura 11.	Caso 3. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	89
Figura 12.	Caso 4. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>AA	89

Figura 13.	Caso 5 Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	90
Figura 14.	Caso 6. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.324C<T	90
Figura 15.	Caso 7. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	90
Figura 16.	Caso 8. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	91
Figura 17.	Caso 9. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	91
Figura 18.	Caso 11. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A	91
Figura 19.	Variante en exón 3 del Gen C19orf12 p.Gly65Glu identificada en el grupo familiar estudiado.....	94
Figura 20.	Paciente caso síndrome olor a pescado.....	102

Introducción

Una enfermedad rara es una patología crónica, debilitante, de alta complejidad, potencialmente mortal y de baja prevalencia, siendo esta de 1 por cada 2.000 personas (Haendel et al., 2020). Si bien para muchas enfermedades raras se desconoce la causa, la mayoría son de origen genético y se segregan con un patrón de herencia; algunas de las enfermedades raras pueden estar asociadas a factores medioambientales o xenobióticos y todas son del interés de la genética humana.

Las personas que cursan con una enfermedad rara con frecuencia afrontan problemáticas como la falta de competencias o conocimientos del personal de salud para la identificación y el manejo oportuno de estas patologías, con la consecuencia de que el diagnóstico se retrase o sea erróneo; por ser condiciones frecuentemente de causa genética, se facilita la potencial propagación a otros familiares, la progresión de la condición en los afectados será inevitable y, aunque muchas veces no se dispone de tratamiento, en todos los casos se afecta la calidad de la vida.

En este trabajo de investigación se analizan tres casos clínicos de condiciones raras: una enfermedad de olor inusual con gran afectación en el relacionamiento social de la persona afectada, una familia con neurodegeneración por depósito de hierro en la que se identificó un fenotipo oculto de enfermedad mental y una persona con la enfermedad de Niemann-Pick bajo tratamiento con un medicamento de alto costo cuyo diagnóstico fue erróneo. Todos ellos acudieron al Centro de Investigación en Genética y Genómica (CIGGUR) de la Universidad del Rosario, en donde se les ofreció diagnóstico genético y genómico, para entender la historia natural de cada condición, además de identificar el gen y los mecanismos biológicos que explican cada una de las condiciones, junto con el patrón de herencia, el riesgo de recurrencia y las opciones terapéuticas y preventivas disponibles a través del asesoramiento genético.

Formulación del Problema

Planteamiento del Problema

Las enfermedades raras, ultra raras y olvidadas hacen parte de un grupo de condiciones de salud crónica, progresivas, potencialmente mortales cuya característica principal es la baja prevalencia. Según la organización mundial de la salud (OMS) existen 7.000 enfermedades raras que afectan a cerca del 7% de la población mundial, de las cuales el 80% tienen origen genético (Radhouane, 2017).

La baja prevalencia hace que las enfermedades raras sean un problema de especial interés en salud, reconocido en Colombia mediante la Ley 1392 del año 2010, debido a que requieren procesos de atención, diagnóstico, tratamiento y prevención altamente especializados, además de un componente de seguimiento administrativo, financiero, de protección y de inclusión social complejos (Ministerio de Salud y Protección , 2010).

En Colombia, el listado más reciente de enfermedades raras incluye 2.198 condiciones actualizadas en la resolución 5265 de 2018 y la ley 1392 de 2010 invita a que organismos especializados, públicos y privados, del orden nacional e internacional, estudien, coordinen, promuevan e implementen el desarrollo de investigaciones en procura de estudiar las enfermedades raras con el objeto de lograr diagnósticos tempranos y la búsqueda de una mejor calidad y expectativa de vida (Ministerio de Salud y Protección Social, 2018).

Por esta razón, el CIGGUR como entidad de investigación adscrita a la Universidad del Rosario, ha venido desarrollando acciones para el cumplimiento de este mandato legal que en el presente caso se materializan mediante el estudio de tres condiciones o enfermedades raras nuevas o novedosas para nuestro entorno.

Justificación

El diagnóstico genético molecular es uno de los estándares de oro para la correcta identificación de las enfermedades raras. La enfermedad de Niemann-Pick del tipo C es una condición hereditaria, autosómica recesiva, que cursa con neurodegeneración, ceguera, sordera, demencia y muerte en los afectados. Aunque los enfermos hoy disponen de un medicamento de alto costo que mitiga la progresión de esta grave enfermedad, es inusual que se revierta el diagnóstico y se interrumpa el tratamiento instaurado cuando una niña afectada y su hermano, se encuentran bajo protección para ser adoptados y se interroga desde los posibles padres adoptantes si verdaderamente ambos niños tienen esta enfermedad para ajustar el sistema de salud del país de destino de estos niños.

La neurodegeneración con depósito de hierro cerebral es una condición rara, heterogénea y hereditaria que cursa con grave deterioro neurológico. Existen, al menos, cuatro tipos de esta condición, cada uno de ellos causado por un gen distinto. El tipo 4 es el menos frecuente y, en el caso de la parentela estudiada, se presenta como un fenotipo clásico en los afectados homocigotos, pero a quienes se los considera heterocigotos, en nuestra familia, se identificó un fenotipo intermedio no muy bien definido previamente en la literatura. En el listado de enfermedades raras de Colombia se podría registrar no solo el fenotipo intermedio de los heterocigotos, sino el subtipo de cada una de las condiciones de neurodegeneración con depósito de hierro, afinando así y aportando precisión al mismo listado.

Una condición médica con olor inusual es un padecimiento poco frecuente que tiene graves consecuencias en la capacidad natural de los humanos para interactuar con otros. El síndrome de olor a pescado (*fish odor syndrome*) es una condición genética infrecuente, determinada por la

mutación de un gen que altera el metabolismo con la producción de intermediarios químicos que se manifiestan de forma ofensiva en todos los fluidos corporales. El estudio de esta grave y rara manifestación clínica es importante por su origen genético o genómico, las consecuencias que presenta para los afectados y, eventualmente, puede dar luces para su manejo o mitigación. En adición, esta condición no se encuentra reconocida aún en la última versión del listado de enfermedades raras de Colombia.

En los tres casos, las personas afectadas no tuvieron acceso a profesionales con las competencias y conocimientos sobre las condiciones raras que los aquejan, tampoco a los medios diagnósticos idóneos, o bien el diagnóstico fue tardío o erróneo. Se ha estimado que el tiempo entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico de una enfermedad rara es de aproximadamente 6 años, en nuestro caso se superó ampliamente esta ventana de tiempo y las personas fueron socialmente olvidadas, discriminadas, estigmatizadas y se afectó para ellos la oportunidad no solo de recibir información sobre su diagnóstico e historia natural, sino también el manejo correcto, la mitigación y la prevención por la falta de canalización y las carencias del sistema de salud al que ellos acudieron buscando ayuda.

Preguntas de Investigación

1. ¿El uso de la medicina genómica permite brindar a las personas con enfermedades raras un abordaje adecuado de su condición a partir del diagnóstico correcto y temprano?
2. ¿Es posible corregir el diagnóstico de una enfermedad rara usando la medicina genómica?

Objetivos

Objetivo General

Determinar las características clínicas y genéticas de tres familias con enfermedades raras que acudieron para evaluación por el equipo del CIGGUR.

Objetivos Específicos

- Establecer las características clínicas personales y familiares de las personas evaluadas.
- Establecer el diagnóstico molecular con el respectivo análisis bioinformático de las variantes identificadas.
- Correlacionar los hallazgos fenotípicos con las variantes encontradas.
- Ofrecer acciones de salud como el asesoramiento genético.

Antecedentes Generales

Enfermedades Raras

El término de enfermedad rara se utilizó por primera vez asociado al concepto de medicamentos huérfanos en los Estados Unidos en el año 1983, cuando fue aprobada la ley *Orphan Drug Act*. Esta ley proporcionaba a las compañías farmacéuticas beneficios financieros con el objetivo de incentivar la producción de medicamentos seguros y eficaces, destinados para el diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades de baja prevalencia para las cuales no se conocía ningún tratamiento (Richter et al, 2015).

Las enfermedades raras son patologías crónicas, debilitantes, progresivas, con una alta tasa de mortalidad y baja prevalencia. Actualmente se conocen unas 7.000 enfermedades raras, que afectan al 7% de la población mundial. Estas enfermedades se encuentran registradas en la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) y en Orphanet. Dentro de este grupo también se encuentran las enfermedades infecciosas raras y los cánceres raros, que tienen sus propias características y complejidades; sin embargo, comparten desafíos clínicos similares, debido a la falta de conocimiento o experiencia para el reconocimiento de enfermedades raras por parte del personal de salud, lo que con frecuencia lleva a que el diagnóstico se retrase o sea erróneo y se dificulte el acceso a un manejo clínico óptimo o, en el peor de los casos, que se administren tratamientos inadecuados que puedan tener efectos nocivos sobre su condición de salud.

Estas enfermedades con frecuencia afectan más de un órgano vital, son multisistémicas y se caracterizan por cursar con complicaciones motoras, cognitivas y/o sensoriales; además, muchas son irreversibles o no cuentan con un tratamiento específico, pero requieren de un manejo

interdisciplinario con el objetivo de reducir la morbilidad, el grado de discapacidad y mejorar la calidad de vida de las personas afectadas. Padecer una enfermedad rara con frecuencia lleva a la discriminación y al aislamiento social, disminuyendo las oportunidades de desempeño, educativas y profesionales.

El diagnóstico genético se inició en el siglo XX con la identificación de los grupos sanguíneos, la identificación al microscopio de los eritrocitos falciformes y la electroforesis de hemoglobina, seguido del cultivo celular para obtener el cariotipo y la secuenciación del primer gen, *HBB*. Estos avances contribuyeron a dilucidar condiciones de herencia mendeliana comunes como la anemia falciforme, la fibrosis quística o la distrofia muscular de Duchenne, además de alteraciones cromosómicas comunes como el síndrome Down o el síndrome Turner. Luego, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) redujo la capacidad resolutive del cariotipo a delaciones o duplicaciones cromosómicas de condiciones un poco menos frecuentes, como los Síndromes Di George o Prader-Willi. No obstante, la heterogeneidad genética que ostentan algunas enfermedades como las sorderas, por ejemplo, requirieron para su estudio el desarrollo de métodos de análisis extensos por el genoma, tales como la secuenciación masiva o secuenciación de siguiente generación, a través del análisis del exoma o del genoma completo. De la misma forma hoy existe el llamado cariotipo molecular o micro arreglos de hibridación genómica comparativa, que identifican a lo largo del genoma microdeleciones o micro duplicaciones cromosómicas que escapan al análisis directo al microscopio (Fernández y Gouveia, 2017).

Se estima que el 80% de las enfermedades raras son de origen genético y el diagnóstico preciso de las mismas es complejo no solo por su rareza, sino debido a la heterogeneidad genética y fenotípica, pero también a que muchas de estas tienen su origen en mutaciones de genes nuevos o

no identificados previamente, o bien están relacionadas con alteraciones de la expresión y función de otros ácidos nucleicos o la epigenética, en lo que se denomina medicina genómica o ciencias ómicas (Sivasubbu et al 2019). Para las enfermedades raras, el uso de la medicina genómica permite llegar, en muchos casos, a diagnósticos rápidos y precisos, así como la identificación completa y la anotación de las variantes causales. Una vez se identifica una variante patogénica, esto es, una mutación, se tendrá un diagnóstico y se podrán implementar medidas terapéuticas generales o específicas, según sea el caso, junto con actividades de prevención mediante el asesoramiento genético. En suma, la correcta identificación o descripción de la enfermedad rara es un paso necesario e importante para apropiarse de la situación y aprender a entenderla y aceptarla.

La disponibilidad de métodos como la secuenciación de siguiente generación (NGS) ha permitido cambiar el flujograma de trabajo en el diagnóstico de personas con sospecha de enfermedades raras, evitando, en algunos casos, el lento y tortuoso trasegar mediante pruebas convencionales como química sanguínea, estudios hormonales, de hematología o de imágenes. Si bien estos son útiles en la medida en que muestran la expresión fenotípica de la mutación presente en un gen, hoy es esencial contar con un diagnóstico genético racional debido a que se acortan los tiempos no solo de diagnóstico, sino para la aplicación de otras evaluaciones y tratamientos, evitándose otros costos al llamar estudios menos informativos.

La NGS ha sido un recurso de la genómica que permite la secuenciación y análisis de cualquier parte del genoma humano de forma rápida y sensible; por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades raras se puede hacer secuenciación de exoma o genoma completo, o bien la secuenciación masiva mediante de paneles de genes relacionados por fenotipos similares, o bien

personalizar el análisis hacia genes que el clínico sospecha puedan estar implicados como causa del fenotipo.

Además de la secuenciación NGS, en la actualidad la medicina genómica cuenta con herramientas en uso con el objetivo de identificar, en las familias en riesgo, la posibilidad de que un miembro nuevo de la familia pueda padecer una enfermedad rara, una vez se ha establecido en una familia determinada un diagnóstico.

Enfermedades Raras en Colombia

En Colombia a partir de la ley 1392 de 2010 se reconocen las enfermedades raras como aquellas condiciones de especial interés por su baja prevalencia en la población. La poca atención y el elevado costo de las enfermedades raras, hizo que se expidieran normas para garantizar la protección social por parte del estado a la población que padece este tipo de enfermedades y a sus cuidadores (Ministerio de Salud y Protección , 2010). Con esta ley se buscó la implementación de acciones para la atención en salud de los enfermos que padecen este tipo de patologías con el objetivo de mejorar su calidad y expectativa de vida.

En nuestro país se definen las enfermedades raras, como aquellas enfermedades crónicamente debilitantes, graves, que amenazan la vida y que tienen una prevalencia menor de 1 por cada 5.000 personas (Instituto Nacional de Salud, 2019). Las enfermedades raras comprenden también las enfermedades ultra raras, definidas como aquellas condiciones poco frecuentes que muestran una prevalencia de 0,1-9 por cada 100.000 personas; además de las enfermedades olvidadas o desatendidas, que son un grupo de enfermedades infecciosas, que afectan a las poblaciones más pobres y con limitado acceso a los servicios de salud.

A nivel mundial se reconocen aproximadamente unas 7.000 enfermedades raras, mientras que en Colombia se han registrado 2.198 patologías incluidas en el listado de enfermedades raras actualizado en la resolución 5265 de 2018, que afectan a 68.723 personas, según el registro nacional de enfermedades raras, las cuales se encuentran concentradas principalmente en Bogotá, el Valle del Cauca y Medellín; de estas, el 56% corresponden a mujeres y el 43% a hombres, con edad inferior a los 20 años. Informa también el registro nacional, que el 80% de las condiciones detectadas son de origen genético (Araque, Beltrán, y Mozo, 2022).

Las cinco enfermedades que concentran más del 20% del total de los casos registrados, en su orden son:

- Esclerosis Múltiple: 5.8%
- Enfermedad de von Willebrand: 5.5%
- Déficit congénito del factor VIII: 5.5%
- Síndrome de Guillain-Barré: 3.4%
- Miastenia gravis: 2.5%

El registro nacional de enfermedades raras informa que el 75% de los pacientes que presentan una patología de estas características, están afiliados al régimen contributivo de salud, aunque este porcentaje puede estar sesgado por la falta de atención en salud de personas que viven en área rural dispersa o en condiciones de extrema pobreza que pertenecen al régimen subsidiado y que pudieran padecer una enfermedad rara o falta de claridad en el diagnóstico.

Se estima que Colombia destina el 7.6 del PIB a la salud y que el gasto público representa la mayoría de los recursos, con el 71.6%, mientras que la participación del sector privado representa el 28.4%.

Al comparar la situación de las enfermedades en Colombia con respecto a otros de países de Sudamérica (Ecuador, Perú y Argentina), no se encuentran diferencias significativas con respecto a los retos que debe afrontar una persona que padece una enfermedad rara; ya que al igual que en nuestro país existe desinformación y poca visualización de estas condiciones lo que en promedio retrasa el diagnóstico entre 8 y 10 años; adicionalmente, no hay claridad en los lugares a los que se debe referenciar un paciente para que pueda acceder a los estudios moleculares que le permitan llegar a un diagnóstico preciso.

Capítulo I

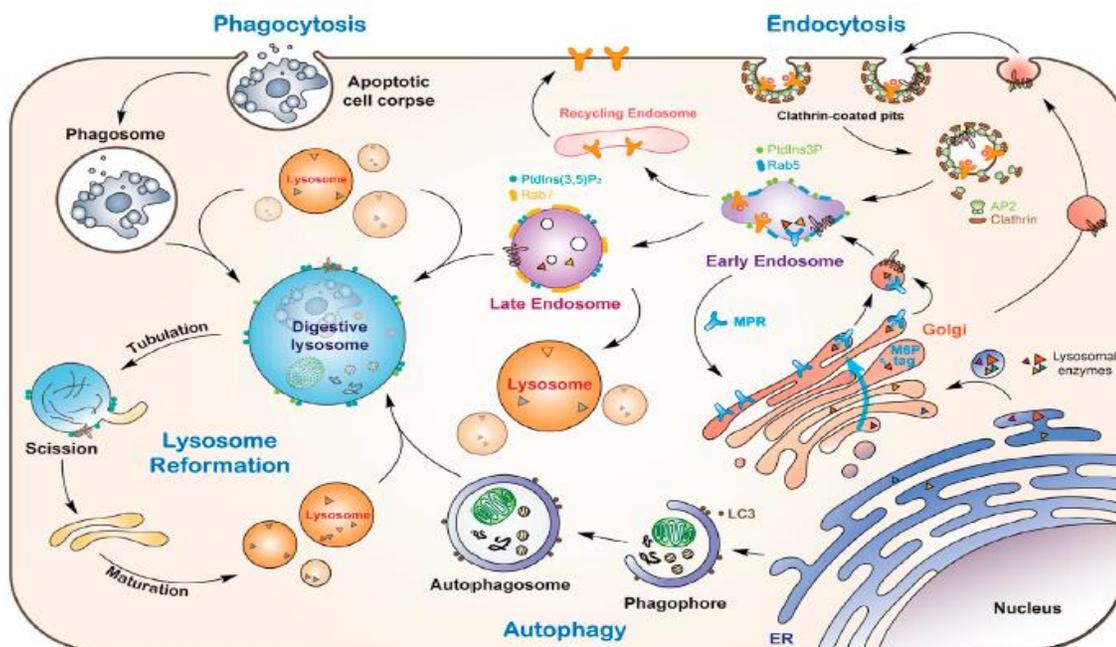
Mal Diagnóstico para una Enfermedad de Depósito Lisosomal

Las enfermedades de depósito lisosomal son un grupo heterogéneo de trastornos multisistémicos de origen genético causadas por mutaciones en genes que codifican para proteínas lisosomales o relacionadas con su función. Estas condiciones se presentan con una incidencia de 1 en 5.000 a 7.500 nacimientos y se caracterizan por tener una evolución crónica, progresiva y debilitante, que conllevan a discapacidades físicas y neurológicas, como resultado de alteraciones en la síntesis y función de las hidrolasas lisosomales (Martina et al., 2021).

Los lisosomas fueron descubiertos en el año 1950 por el bioquímico de origen belga Christian de Duve, lo que lo hizo merecedor de un premio Nobel. Los lisosomas son organelos intracelulares, que se encuentran presentes en todas las células eucariotas y desempeñan funciones importantes en la homeostasia, señalización y adaptación celular (Martina et al., 2021; Yang y Wang, 2021).

Estos organelos contienen diferentes enzimas llamadas hidrolasas ácidas (lipasas, glucosidas y proteinasas), que son glicoproteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso, en donde se lleva a cabo la N-glucosilación, para ser llevadas posteriormente al aparato de Golgi, en donde reciben el ligando manosa 6 fosfato para que así puedan ser reconocidas por el lisosoma y, de esta manera, se pueda realizar la digestión de macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas de los ácidos nucleicos por endocitosis, así como la degradación de células apoptóticas, de bacterias por fagocitosis y de organelos dañados por medio de la autofagia de contenidos citoplasmáticos.

Figura 1.
Vías de digestión lisosomal



Nota: Yang, C y Wang, X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. 2021.

Las enfermedades de depósito lisosomal se producen por mutaciones que conllevan a la alteración en el funcionamiento de las enzimas hidrolasas, o defectos en los canales o transportadores lisosomales, lo que lleva a disfunción lisosomal por acumulación de sustratos y alteraciones en la homeostasia. La constante acumulación de material no metabolizado produce hipertrofia de los lisosomas con disfunción celular, destruyendo las células afectadas por el aumento de citosina o el incremento intracelular de óxido nítrico. Las manifestaciones clínicas de estos trastornos no solo son el resultado del material depositado, sino que también lo son de la interferencia de los mecanismos de señalización intra e intercelular (Xu y Ren, 2015).

Las enfermedades de depósito lisosomal son monogénicas y tienen un patrón de herencia autosómica recesiva, excepto en la enfermedad de Hunter, la enfermedad de Danon y la enfermedad de Fabry, que son de herencia recesiva ligada al cromosoma X (Platt et al., 2018).

Las enfermedades lisosomales se pueden clasificar según el material que se deposita en la Tabla 1.

Tabla 1.
Clasificación de las enfermedades lisosomales

GRUPO	ENFERMEDAD LISOSOMAL
	Tipo I Enfermedad de Von Gierke
	Tipo II Enfermedad de Pompe
	Tipo III Enfermedad de Cori y Forbes
GLUCOGENOSIS	
Depósito de glucógeno	Tipo IV enfermedad de Andersen
	Tipo V Enfermedad de MacArdle
	Tipo VI enfermedad de Hers
	Tipo VII Enfermedad de Tauri
GLUCOPROTEINOSIS	Manosidosis
Depósito de glucoproteínas	Fucosidosis

Sialidosis

Aspartilglucasaminuria

Enfermedad de Schindler

Enfermedad de Niemann Pick tipo C

LIPIDOSIS

Enfermedad de Wolman

Lipofuscinosis neuronal Ceroidea

Enfermedad de Gaucher

Enfermedad de Niemann Pick tipos AyB

Enfermedad de Fabry

Enfermedad de Farber

ESFINGOLIPIDOSIS

Enfermedad de Sandhoff

Acumulación de esfingolípidos

Enfermedad de Tay Sachs

Enfermedad de Krabbe

Gangliosidosis GM1

Leucodistrofia metacromática

	Síndrome de Hurler
	Síndrome de Scheie
MUCOPOLISACARIDOSIS	Síndrome de Hunter
Depósito de glucosa-aminoglucanos o mucopolisacáridos	Síndrome de San Filippo (A, B, C y D)
	Síndrome de Morquio (A y B)
	Síndrome de Maroteaux-Lamy
	Síndrome de Sly

	Deficiencia múltiple de Sulfatasa
DEFECTOS MÚLTIPLES DE ENZIMAS	Galactosidosis
	Mucopolisacaridosis II/III
	Mucopolisacaridosis IV

OTRAS ENFERMEDADES DEBIDAS A DEFECTOS DE PROTEÍNAS LISOSOMALES	Cistinosis
	Enfermedad por depósito de ácido siálico

DEFECTOS DEL TRANSPORTE LISOSOMAL	Cistinosis
	Enfermedad por depósito de ácido siálico

Nota: Saudubray J y García, À (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am*. Pp 179-208.

Teniendo en cuenta los casos clínicos que se presentarán en este capítulo, el marco teórico será restringido a las enfermedades de depósito lisosomal del tipo lipidosis y esfingolipidosis.

Dentro de las enfermedades de depósito lisosomal, en las que por defectos enzimáticos se acumulan esfingomielina, colesterol y otros lípidos en las células del cerebro, el hígado y el bazo, principalmente, se encuentran las lipidosis, de las que hace parte la enfermedad de Niemann Pick tipo C y las esfingolipidosis como la enfermedad de Niemann Pick tipo A y Niemann Pick tipo B.

La Enfermedad de Niemann Pick (NP) fue descrita por primera vez en 1914 en una joven de 18 años de origen askenazi por el pediatra alemán Albert Niemann; pero fue hasta el año 1927, que el patólogo alemán Ludwig Pick la describió como una entidad propia, al diferenciarla histológicamente de la enfermedad de Gaucher (Zafra et al., 2018).

La enfermedad NP incluye un grupo de trastornos hereditarios con un patrón de herencia autosómico recesivo, que asocia hepatomegalia, esplenomegalia y déficit neurológico. En el año 1961, Crocker clasificó la enfermedad en cuatro tipos en función de los órganos comprometidos, la edad de presentación y los síntomas referidos: NP tipo A (NPA), NP tipo B (NPB), NP tipo C (NPC1) y NP tipo D (NPD o bien NPC2) (Crocker, 1958). Posteriormente, en el año 1966, se propuso una nueva clasificación de la enfermedad de NP, que se mantiene vigente hasta el día de hoy, en donde el grupo de enfermedades se clasifica en dos categorías (Brady et al., 1966 y Kolodny, 2000).

Enfermedad de Niemann Pick tipo I (NPI): tiene una incidencia de 1 en 250.000, en esta categoría se encuentran NPA y NPB y es causada por la deficiencia de la esfingomielinasa ácida, que lleva a la acumulación de esfingomielina en las células de diferentes órganos, comprometiendo su funcionamiento. Este tipo de NPI se presenta por mutaciones en el gen *ASM*, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.1-15.4). La enfermedad NPA se presenta en la etapa neonatal, tiene una progresión rápida de la enfermedad presentando una muerte temprana alrededor de los 3 años de edad. Por otro lado, la enfermedad NPB, tiene una edad de presentación variable, ya que puede presentarse en la niñez tardía, en mayores de 6 años o incluso en la adultez (Wang et al, 2011).

Enfermedad de Niemann Pick tipo II (NPII): tiene una incidencia de 1 en 120.000-150.000, en esta categoría se encuentran las condiciones de NPC y NPD; se caracteriza por presentar defectos en el transporte de lipoproteínas de baja densidad, que llevan a la acumulación de colesterol libre y glucoesfingolípidos en órganos y tejidos (Wang et al, 2011). Los genes relacionados con este tipo de presentación son: *NPCI*, responsable del 95% de las mutaciones que causan NPC, este gen se encuentra localizado en el cromosoma 18 (18q11.2); el otro gen, relacionado en el *NPC2*, se encuentra localizado en el cromosoma 14 (14q24.3) (The GeneCards , 2014) y en este tipo de enfermedad NP, los síntomas se pueden presentar a cualquier edad, pero lo común es que se presente en niños y adolescentes.

A continuación, se presentarán las características clínicas de los diferentes tipos de enfermedad NP y se mencionan los métodos diagnósticos (ver Tabla 2).

Tabla 2.
Características y diagnóstico de la enfermedad de Niemann Pick

TIPO	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
Niemann Pick A	<p>Inicio: los primeros meses de vida.</p> <p>Manifestaciones: ictericia neonatal prolongada, distensión abdominal por hepatoesplenomegalia, hacia los 3-6 meses de edad, enfermedad pulmonar intersticial, dificultad para comer, pérdida de las habilidades motoras tempranas, pérdida rápidamente progresiva de la función neurológica, neuropatía periférica, mancha roja macular en la retina e infecciones respiratorias de repetición.</p> <p>Pronóstico. La muerte típicamente es por insuficiencia respiratoria, ocurre a la edad de dos o tres años.</p>	<p>Actividad de esfingomielinasa ácida residual < 10% con respecto al control.</p> <p>Estudio molecular del gen <i>SMPDI</i></p>
Niemann Pick B	<p>Inicio: en la época de lactancia o en la infancia, edad escolar.</p> <p>Manifestaciones: hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, estatura baja con retraso en la maduración esquelética, enfermedad pulmonar</p>	<p>Actividad de esfingomielinasa ácida residual < 10% con respecto al control.</p>

	<p>intersticial, hiperlipidemia, anomalías oculares, anomalías neurológicas como signos cerebelosos, nistagmo, afectación extrapiramidal, retraso mental, trastornos psiquiátricos y neuropatía periférica.</p> <p>Pronóstico: Generalmente menos severo que NPA, la mayoría de los pacientes afectados sobreviven hasta la edad adulta.</p>	<p>Estudio molecular del gen <i>SMPD1</i></p>
<p>Niemann Pick C1 y C2</p>	<p>Amplio espectro fenotípico. El inicio varía desde in útero hasta la lactancia, la infancia, la edad escolar o la edad adulta.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Casos prenatales: se presentan con ascitis fetal. • Casos de inicio neonatal: con enfermedad hepática grave y / o insuficiencia respiratoria; se puede presentar hipotonía y retraso en el neurodesarrollo con poca o ninguna implicación hepática y pulmonar. • Casos de inicio en infancia media o tardía: después del desarrollo temprano normal. Las manifestaciones neurológicas son afectación cerebelosa, distonía, disartria, disfagia de 	<p>Tinción con filipina positiva en fibroblastos cultivados de la piel.</p> <p>Estudios moleculares de los genes <i>NCP1</i> y <i>NPC2</i></p>

origen central y las convulsiones, también se presenta oftalmoplejía supranuclear vertical y deterioro cognitivo lentamente progresivo.

Pronóstico: la muerte generalmente ocurre por neumonía por aspiración en la segunda o tercera década de la vida, cuando se presenta en la adultez es similar a los casos de menores, pero con una progresión más lenta.

Nota: Patterson, M.C. (2020). Overview of Niemann-Pick disease. In Dashe, J.F. (Ed.).

La enfermedad NPA y NPB, como la mayoría de las enfermedades raras, no tiene un tratamiento farmacológico específico que sea capaz de alterar el ritmo de la enfermedad. En los pacientes con diagnóstico de NPC con manifestaciones neurológicas pediátricas y los adultos, está indicado el uso de miglustat, que es un fármaco que inhibe la catalización del primer paso para la síntesis de los glucoesfingolípidos (Wraith, 2009; Wraith et al., 2010). Los pacientes que padecen esta condición requieren de un cuidado interdisciplinario para el manejo sintomático, para disminuir el grado de discapacidad y, de alguna manera, mejorar su calidad de vida.

Dentro de las esfingolipidosis, se encuentra la enfermedad de Sandhoff (ES), que es una enfermedad autosómica recesiva que se presenta por la acumulación de gangliósidos GM2 en las neuronas principalmente, por mutaciones en el gen *HEX-B* (Im-Aroon et al., 2021), localizado en el cromosoma 5 (5q13.3), que junto a la proteína activadora del cofactor GM2, catalizan la degradación de los gangliósidos GM2 y de otras moléculas que contienen N-acetilhexosaminas terminales (The GeneCards, 2014).

La enfermedad de Sandhoff, se puede presentar en diferentes etapas de la vida, lo que hace que sea fenotípicamente diversa, en el siguiente cuadro se describen los diferentes tipos de presentación de esta condición (Xiao et al., 2022).

Tabla 3.

Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Sandhoff según su edad de presentación

TIPO	CLÍNICA
Enfermedad de Sandhoff infantil aguda	<p>Inicio: 6 meses</p> <p>Manifestaciones: Los bebés generalmente son normales al nacer, pero presentan debilidad progresiva y ralentización del progreso del desarrollo, luego regresión del desarrollo y deterioro neurológico grave, acompañado de convulsiones.</p> <p>Pronóstico: la muerte generalmente ocurre entre las edades de dos y tres años.</p>
Enfermedad de Sandhoff juvenil subaguda	<p>Inicio: 2-5 años</p> <p>Manifestaciones: Después de alcanzar los hitos del desarrollo normal, el progreso del desarrollo se ralentiza, seguido de una regresión del desarrollo y</p>

deterioro neurológico, ataxia, disartria y deterioro cognitivo.

Pronóstico: la muerte ocurre generalmente por aspiración, generalmente ocurre entre los primeros y últimos años de la adolescencia.

Enfermedad de Sandhoff de inicio tardío

Inicio: en la adolescencia o la adultez temprana

Manifestaciones: El desarrollo psicomotor casi normal es seguido por una variedad de hallazgos neurológicos como debilidad, espasticidad, disartria y deficiencias en la función cerebelosa, además de alteraciones en la función ejecutiva y la memoria.

Pronóstico: la esperanza de vida no se reduce necesariamente.

Nota: Xiao, C, Tiffit, C, Toro, C. (2022). Sandhoff Disease, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington S 1993–2022.

El diagnóstico de la enfermedad de Sandhoff, se realiza a partir de la medición de la actividad enzimática de hexosaminidasa, a partir de una muestra de plasma o glóbulos rojos en la que se analiza la hexosaminidasa total, por medio de la cuantificación proteica (Folin-Lowry y BCA), posteriormente se generan los valores de actividad enzimática de las isoformas A y B por medio de la inactivación térmica. También se hace el diagnóstico a partir de la identificación de variantes bialélicas en estudios moleculares para el gen *HEXB* (Cachón y Zaccariotto, 2018).

La enfermedad de Sandhoff tampoco tiene tratamiento farmacológico, el manejo es sintomático y multidisciplinario.

Otra patología que hace parte del grupo de las esfingolipidosis es la enfermedad de Fabry (EF) o enfermedad de Anderson-Fabry en honor a los médicos que la describieron; esta condición es pan étnica y tiene una incidencia de 1 en 100.000 (Germain, 2010). La EF es causada por mutaciones en el gen *GLA*, que codifica para la enzima alfa-galactosidasa, encargada de la degradación de las globotriaosilceramidas, las cuales cuando la proteína no funciona adecuadamente se van a acumular en las células del sistema nervioso, los riñones, del corazón y la piel (Mehta et al., 2022). Esta patología tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X y se ha observado que presenta penetrancia intermedia en las mujeres, ya que alrededor del 70% de las mujeres que presentan esta variante genética tienen manifestaciones leves de la enfermedad de Fabry, esto debido a la inactivación selectiva o sesgada de un cromosoma X, mientras que el 100% los hombres presentan las complicaciones multisistémicas derivadas de esta patología (HCN, 2015).

En el siguiente cuadro se describirán las características clínicas que presentan los pacientes que presentan la EF. (Cuadro 4)

Tabla 4.*Compromiso multisistémico y manifestaciones clínicas de la EF*

ÓRGANO / SISTEMA	SIGNOS Y SÍNTOMAS
Sistema nervioso	Enfermedad cerebrovascular
	Dolor neuropático
	Acroparestesias
Sistema Digestivo	Náuseas, vómito, diarrea
	Dolor abdominal
	Malabsorción intestinal
	Dispepsia
	Hiporexia
Dificultad para ganar peso	
Sistema cardiovascular	Alteraciones de la variabilidad de la frecuencia cardíaca
	Hipertensión arterial
	Angina e infarto agudo de miocardio

	Arritmias
	Alteraciones en el ECG
	Insuficiencia valvular
	Hipertrofia del ventrículo izquierdo

Piel	Angioqueratomas
	Hipohidrosis
	Intolerancia al calor

	Insuficiencia renal
Riñones	Microalbuminuria, proteinuria
	Hiperfiltración
	Aumento de excreción urinaria de Gb3

Ojos	Opacidades corneales y lenticulares
	Vasculopatías en retina y conjuntiva

Oídos	Anomalías vestibulares
--------------	------------------------

Hipoacusia

Sordera

Nota: Germain, DP. (2010). Fabry disease.

Para diagnosticar la EF, se realiza la medición de la actividad enzimática de alfa galactosidasa en glóbulos blancos o en fibroblastos. Cuando los niveles de la actividad enzimática están por debajo del 25% de lo normal se considera que el paciente cursa con EF. El estudio enzimático es útil en los hombres, ya que las mujeres pueden tener los niveles enzimáticos levemente disminuidos o normales por los cambios aleatorios por la inactivación del cromosoma X (HCN, 2015), el diagnóstico se confirma con análisis del gen *GLA*.

Con respecto al tratamiento de esta enfermedad de depósito lisosomal, este debe ser dirigido al manejo de signos y síntomas, lo que incluye medicamentos para el manejo de dolor neuropático como gabapentina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en caso de presentar hipertensión con órgano blanco el riñón; y, de ser necesario, considerar la terapia de reemplazo renal. A diferencia de otras enfermedades raras esta cuenta con tratamiento específico, llamado agalsidasa beta (Fabrazyme), este es un tratamiento de terapia de reemplazo enzimático que se indica para mejorar los síntomas y estabilizar la función de los órganos, ya que reemplaza la alfa galactosidasa endógena deficiente (Mehta et al., 2022)

Presentación de Casos clínicos

Caso 1

Información clínica:

Se trata de un niño de 9 meses de edad, valorado en consulta por el antecedente de una hermana con el diagnóstico de enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPDC). Se preguntaba si el niño estaba afectado por esta condición, o si padecía alguna condición genética metabólica o neurológica.

Él es producto de la sexta de gestación de una hermandad de seis, la gestación cursó sin controles prenatales y se desconoce la vía del parto y otros antecedentes, ya que desde el primer día de vida estuvo bajo la protección del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF), encontrándose en proceso de adopción. Comenta la madre sustituta que el niño ha sido sano, con un adecuado desarrollo psicomotor, dado por sostén cefálico al mes, cambios de decúbito a los 2 meses, agarre de objetos a los 3 meses, sonidos guturales a los 4 y sedestación a los 7 meses.

El examen físico mostró talla de 72 cm (P50), envergadura de 69.5 cm, perímetro cefálico 45 cm (P50) segmento inferior de 30 cm, sin alteraciones en su valoración cefalocaudal y sin déficit neurológico motor o sensitivo.

El niño presentaba un aspecto sano, con un neurodesarrollo adecuado para su edad; pero, dada su condición de adaptabilidad en un país extranjero, la ausencia de datos familiares fiables y el antecedente de una hermana biológica posiblemente afectada con una condición hereditaria, se solicitó un estudio de ADN comprensivo mediante un exoma de diagnóstico, con un panel customizado de 354 genes que incluyó todos los implicados en la enfermedad de Niemann Pick,

así como para otras enfermedades neurológicas y metabólicas hereditarias que pudieran ser diagnósticos diferenciales de (NPD).

El panel multigénico no mostró mutaciones en el ADN para ninguno de los genes implicados en la enfermedad de Niemann Pick tipo C (*NPC1* y *NPC2*), ni para las variantes *NPD-A* y *NPD-B* de la misma enfermedad, lo que permitió excluir en el niño el diagnóstico de enfermedad de Niemann Pick. Por el contrario, se le identificó como portador (sano) de una variante en estado heterocigoto en el gen *HEXB*, localizado en la región cromosómica 5q13.3, que codifica la subunidad beta de la enzima hexosaminidasa, involucrada en el metabolismo de gangliósidos. Las mutaciones homocigotas y heterocigotas compuestas en este gen son causales de la enfermedad de Sandhoff. La variante encontrada *HEXB*: c.300-18_300-2 del (NM_000521), se trata de una variante nueva al no hallarse reportada en las bases de datos Ensembl, Refseq, gnomAD, ExAC, Clinvar, ni la literatura. La presencia de esta variante fue confirmada por secuenciación de Sanger y los estudios moleculares fueron realizados en Genética Molecular de Colombia.

Con los resultados obtenidos, se brindó asesoramiento genético a defensora del menor y a la directora de adopciones de Noruega, con lo cual se descartaron las sospechas clínicas y mejoró su condición de adoptabilidad.

Caso 2

Información clínica:

Debido a los hallazgos encontrados en el estudio de diagnóstico genético en el hermano menor, surgió la pregunta de si la hermana, quien tenía diagnóstico de una enfermedad neurológica

degenerativa como lo es la enfermedad de Niemann Pick del tipo C, pudiera tener la enfermedad de Sandhoff. Por este motivo se solicitó el permiso para conocer y acceder a la niña en consulta en el CIGGUR de la Universidad del Rosario.

En el momento de la valoración, ella tenía 10 años de edad y se encontraba bajo la protección del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Desde los 6 años, se encuentra bajo el cuidado de una madre sustituta, quien refiere que la menor con frecuencia presentaba mialgias en extremidades superiores e inferiores, cefalea, náuseas, hiporexia con pobre ganancia de peso. Comentó que se encuentra en manejo por neuropediatría con diagnóstico de Enfermedad de Niemann Pick tipo C, para lo que recibe manejo con Miglustat (Zavesca). Es la quinta de una hermandad de seis, al parecer nació por parto natural y, al igual que su hermano menor, se desconocen otros datos.

Figura 2.

Foto de la niña del caso número 2, autorizada por el defensor de Familia del ICBF.



Al momento de la valoración se encontraba cursando cuarto grado, con buen rendimiento escolar.

Al examen físico: peso 21 kg (P25), talla 121 cm (P3), la fundoscopia fue normal y el examen físico no mostró alteraciones y el examen neurológico fue normal, sin déficit focal o sensitivo.

Estudios Moleculares

Análisis molecular del gen Hexosaminidasa B (*HEXB*)

Metodología

A partir de una muestra de sangre venosa se efectuó extracción de ADN genómico total por técnicas convencionales. Se amplificó por PCR la región codificante completa, las uniones intrón-exón y 263 pares de bases de la región promotora del gen *HEXB* (ENST00000261416.12). El amplicón fue purificado por medio de fosfatasa alcalina y exonucleasa I, y secuenciado directamente en la totalidad de su longitud. La secuencia de la paciente fue comparada con la secuencia de referencia. La numeración de los nucleótidos se inició con respecto a la primera adenina (A) del codón de inicio ATG en la posición 1.

Se realizó diseño de *primers* para los 14 exones y diseño de *primers* específicos de secuenciación.

Diseño de primers para el ORF de HEXB. Teniendo en cuenta que el ORF (open reading frame) del gen *HEXB* consta de 13 exones, se realizó el diseño de los primers de amplificación y secuenciación con la herramienta bioinformática PRIMER3 (v. 0.4.0) usando como Tann promedio entre 60°C y 62°C.

Tabla 5.*Condiciones de estandarización de PCR para el ORF de HEXB*

EXON	PCR		CONDICIONES		SECUENCIACIÓN
	Primer Froward	Primer Reverse	Tm	Extensión	Primers
1	TTTAGCCATCCCGT GTTTGAGG	CCACCCTCCTACTGCT TCTTAA	62.67	50	
2	GGCTTCATATGTCA CTTCAGAG	AAAACATCTGTATCC ATGATCTC	60.81	45.45	CTCCATGCTAGGAACC ACTGAGT
3	CATGGAGTTGACAC CCAAATTC	GATGCTCTTGGGACT GTAATGTT	60.99	45.45	CATAAAGCATGGGAGA GGTCAG
4-5	AGAAATTATGGTAG AGGGTGTAGG	GCCCTTTACATATACT CCCAT	61.15	42.86	GTAGTTTGGAACAGGG GAATTTG
6	GCAGACATATTGGA AGCAATTC	GGGAATTTTAGAGGT GAGAGTGTT	61.15	61.15	CTTATGGATAGAATCA AAGTG
7	TCTACTCCTGAAAC TATGGCAC	CTGTGTCTATTGTGAG	60.81	45.45	GTGCAGTAGTACAATC TCGGCT
8	AATGGGAAACAAA GAGGCAAAG	CCTGTTGCATTGAAGT AGCTGT	60.81	45.45	GTAAGATGATTCTTA AAACCC
9	TCCTGAGATGGTAG ATTTGTGG	GTTGAAATATAGGAA GGCAGTC	60.81	45.45	CTGCACAACCTGATGTT AGGCATGT
10	ACAATTTCTGAGT TGCCTACC	CACATGGCACTAACT CTGAAGAA	60.99	45.45	
11	CCCTAAAATGAGTA TCACATGGCAC	CTCAAGAAACCATAC AGTTGCCTA	62.94	44	
12 - 13	TCCAACCTTCTATTC CCTGGCAC	GTGTAACCTAGAACT CCATCTTGAG	62.67	50	CATCTCCCAAGGTCCT GCTAAC
14	TGGTGTAACCTAGA ACTCCATCTTG	ATACACTGCTCAACC GGAGAAG	62.67	50	

Posteriormente los productos de PCR amplificados fueron verificados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio.

Análisis de los productos de secuenciación de Sanger de *HEXB*

Los productos amplificados fueron secuenciados mediante la metodología de Sanger, la secuenciación fue realizada en un secuenciador automático ABI PRISM 3500xl por la empresa Elim Biopharm. Luego los archivos producto de esta secuenciación en formato ab1 se analizaron de forma manual a través del visualizador de cromatogramas Geospiza FinchTV Version 1.4.0. Se consideraron para el análisis las secuencias de óptima calidad, que permitieran identificar claramente las variantes homocigotas o heterocigotas. Se utilizó la herramienta bioinformática de alineamiento de secuencia múltiple MUSCLE, para comparar las secuencias obtenidas y las correspondientes a la versión WT de *HEXB* tomadas de la base de datos ensembl usando el transcrito identificado como ENST00000261416.12.

Posteriormente, con las variantes identificadas en la secuenciación de Sanger, se realizó una traducción in silico, usando Expasy.

La potencial patogenicidad de las variantes identificadas se analizó por medio de Polyphen-según la base de datos Swiss-prot. También se utilizó SIFT adicionalmente, se utilizó Mutation Taster como un tercer predictor de patogenicidad.

Estudio de ADN mediante secuenciación de siguiente generación - exoma de diagnóstico y panel comprensivo para enfermedades lisosomales

Metodología

Secuenciación de exoma completo y detección de variantes

El DNA genómico fue extraído de la muestra clínica (sangre) de la niña, a partir de la cual se preparó una librería genómica utilizando los protocolos de Illumina con enriquecimiento en las regiones codificantes del genoma (exoma) utilizando hibridación y captura. La secuenciación fue realizada usando un equipo Illumina NovaSeq 6000. Las lecturas obtenidas fueron mapeadas y comparadas con el genoma de referencia (hg19) y el llamado de variantes fue realizado utilizando la aplicación GATK v4.0.5.1.

Análisis de variantes y generación del reporte

Las variantes obtenidas fueron anotadas y analizadas utilizando el software VarSeq v2.2.1. Procesos de filtrado y análisis permitieron incluir variantes en regiones exónicas y los sitios adyacentes a las regiones de corte y empalme del genoma (*splicing*). Se tomaron en cuenta aquellas variantes con una frecuencia alélica menor del 1%, según gnomAD v2.1.1. En adición, se estudió de manera específica un panel comprensivo de genes relacionados con enfermedades lisosomales, el cual se relaciona a continuación: *AP3B1, ARSA, ARSB, ASAH1, BLOC1S3, CLN10, CLN3, CLN5, CLN6, CLN7, CLN8, CTNS, CTSA, CTSK, DTNBP1, FUCA1, GAA, GALC, GALNS, GBA, GLA, GLB1, GM2A, GNPTAB, GNPTG, GNS, GUSB, HEXA, HEXB, HGSNAT, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, HYAL1, IDS, IDUA, LAMP2, LAMP3, LIPA, MAN2B1, MANBA, MCOLN1, NAGA, NAGLU, NEU1, NPC1, NPC2, PPT1, PSAP, SGSH, SLC17A5, SMPD1, SUMF1 y TPP1.*

Medición de actividad enzimática de hexosaminidasa y alfa galactosidasa

Metodología

La actividad de hexosaminidasa, la de hexosaminidasa A y B, así como la actividad enzimática de alfa galactosidasa, se evaluaron mediante ensayos de fluorometría. Para ello, se separaron los leucocitos de 10 ml de sangre heparinizada. A continuación, el sedimento de leucocitos recibió lisis mediante sonicación y la determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Folin-Lowry. Finalmente, se determinó la actividad catalítica de la enzima mediante 4-metilumbeliferil- β -D-acetil-glucosamina (MUG, Sigma-Aldrich) y 4-metilumbeliferil- α -D-galactopironiside (Santa Cruz Biotechnology) para hexosaminidasas totales y α - galactosidasa, respectivamente 30. La actividad enzimática se expresa como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de sustrato por hora. Los estudios enzimáticos fueron realizados en el laboratorio de errores innatos del metabolismo, del hospital San Ignacio.

Resultados

El análisis molecular del gen *HEXB* (ENST00000261416.12) identificó en la paciente analizada tres variantes:

1. La primera en la región 5'-UTR que corresponde a una delección heterocigota:
c.-122delC
2. La segunda en la región 5'-UTR que corresponde a un cambio puntual heterocigoto:
c.-126C>T

3. La tercera en el intrón 1 que corresponde a una delección heterocigota:

c. 300-18_300-3del (Figuras 3 y 4 respectivamente)

Figura 3.

Electroferograma que indica la presencia de las variantes genéticas heterocigotas en 5'UTR c.-122delC y c.-126 C<T

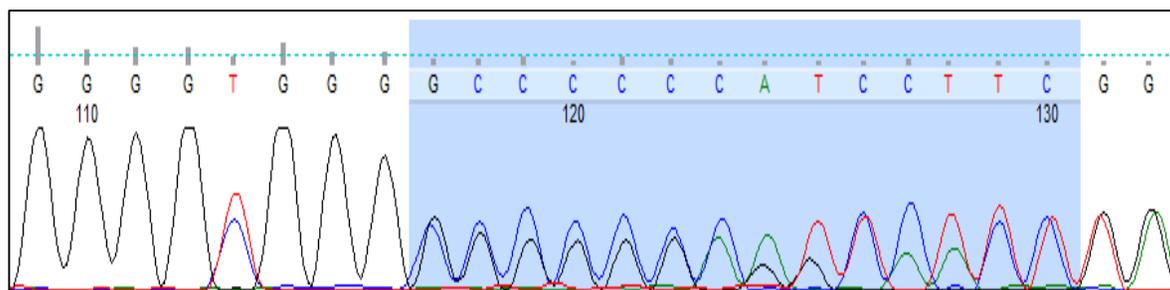
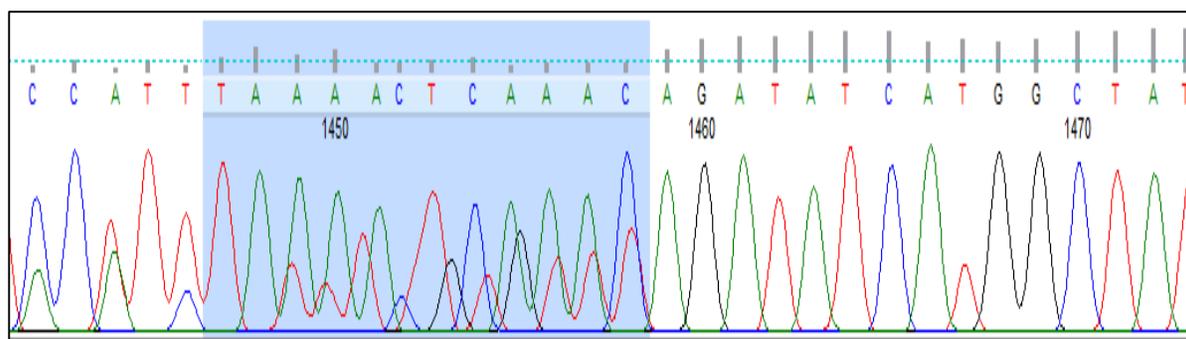


Figura 4.

Electroferograma que indica la presencia de la variante genética en el intrón 1: c- 300-18_300-2del



En el estudio de WES se identificaron cinco (5) variantes, dos de ellas probablemente patogénicas, dos variantes de significado clínico incierto y una benigna, las cuales se presentan a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6.
Variantes encontradas en secuenciación de exoma

Gen de identificación de la variante	Tipo	Cigocidad	Fenotipo asociado y herencia	rs/frecuencia poblacional	Patogenicidad
<i>AP3B1</i>					
NM_003664.4: c.2995G>A	Exónica	Heterocigota	Síndrome Hermansky-Pudlak 2 (AR)	rs146503597/ 0.00413124	Variante de significado incierto (ClinVar).
NP_003655.3: p.Val999Met	No sinónima				Benigna en un reporte.
<i>GLA</i>					
NM_000169.2: c.1124G>C	Exónica	Heterocigota	Enfermedad de Fabry (XL)	rs869312164/ No disponible	Probablemente patogénica (ClinVar).
NP_000160.1: p.Gly375Ala	No sinónima				
<i>HEXB</i>					
NM_000521.3: c.300-18_300-2del	Intrónica Sitio de splicing	Heterocigota	Enfermedad de Sandhoff (AR)	No disponible/ No disponible	Probablemente patogénica (Predicción computacional)

HPS5

NM_181507.1:	Exónica		Síndrome	rs144875223/	
c.2537C>T	No	Heterocigota	Hermansky-		Benigna (ClinVar).
NP_852608.1:	sinónima		Pudlak 5 (AR)	0.00477843	
p.Pro846Leu					

MAN2B1

NM_000528.3:	Exónica		Alfa	rs45576136/	Variante de significado
c.844C>T	No	Heterocigota	manosidosis		incierto (ClinVar).
NP_000519.2:	sinónima		(AR)	0.00259669	Benigna en un reporte.
p.Pro282Ser					

Variante AP3B1 NP_003655.3 p.Val999Met

Mutaciones en el gen *AP3B1* se han asociado al Síndrome Hermansky-Pudlak tipo 2, una entidad autosómica recesiva caracterizada por albinismo oculocutáneo, diátesis hemorrágica, y en algunos individuos, fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa e inmunodeficiencia (Huizing et al., 2021). La variante *AP3B1* c.2995G>A (p.Val999Met), ha sido reportada previamente (rs146503597) y aunque existen interpretaciones conflictivas de patogenicidad según ClinVar, al menos un estudio la reporta como benigna. El fenotipo no es compatible con los hallazgos de la paciente.

Variante GLA NP_000160.1 p.Gly375Ala

El gen *GLA*, codifica para la enzima lisosomal alfa-glucosidasa A, responsable del metabolismo de globotriaosilceramidas. Mutaciones en *GLA* conllevan a la acumulación de glicosfingolípidos en todo el organismo, particularmente en las células que recubren los vasos sanguíneos de la piel, los riñones, el corazón y el sistema nervioso (Germain, 2010). Las mutaciones en *GLA* se han asociado con la enfermedad de Fabry, una entidad con un patrón de herencia ligado al cromosoma X, en el que se han descrito también casos de mujeres portadoras afectadas con diversos grados de severidad (Maier et al., 2006, Perretta et al., 2018).

Usualmente los síntomas aparecen durante la infancia o adolescencia y consisten en crisis periódicas de dolor severo en extremidades (acroparestesias), lesiones vasculares cutáneas (angioqueratomas), enfermedad renal crónica, miocardiopatía, arritmia, estenosis de válvulas cardíacas, intolerancia al calor por hipohidrosis, accidente isquémico transitorio, enfermedad cerebrovascular y demencia. Existen dos fenotipos de la enfermedad de Fabry: la forma clásica o de inicio temprano, en la que los pacientes tienen muy poca o ninguna actividad enzimática con aparición de los síntomas en la primera infancia o en la adolescencia y la forma no clásica, o de aparición tardía, en la que los pacientes tienen alguna actividad enzimática con aparición de los síntomas en la edad adulta (Arends et al., 2017). Se ha descrito que mujeres portadoras tienen un fenotipo más leve que hombres afectados; sin embargo, pueden manifestar muchas de las características clásicas de esta patología, incluidas anomalías del sistema nervioso, enfermedad renal y dolor crónico; adicionalmente, tienen un mayor riesgo de presentar hipertensión arterial, cardiopatías, enfermedad cerebrovascular y daño renal (Wang et al., 2007). La variante *GLA* C.1124G>C (p.Gly375Ala), ha sido reportada previamente (rs869312164) y es considerada

patogénica según ClinVar. Los ensayos *in vitro* de esta variante muestran una actividad enzimática residual de $44.1\% \pm 10.1$ (Lukas et al., 2016).

Variante HEXB NM_000521.3 c.300-18_300-2del

Mutaciones en el gen *HEXB* (que codifica la enzima hexosaminidasa B), se han asociado a enfermedad de Sandhoff, una entidad autosómica recesiva caracterizada por neurodegeneración progresiva, causada por acumulación de gangliósidos GM2, particularmente en neuronas (Breiden y Sandhoff, 2019). La variante no ha sido reportada previamente y se encuentra en un sitio aceptor de *splicing*. El análisis de la variante, utilizando el software SpliceAI (Jaganathan et al., 2019), reporta un puntaje de 0,94 (alta precisión >0.8), para pérdida del sitio aceptor de *splicing*, sugiriendo que la variante es probablemente patogénica. La forma clásica de enfermedad de Sandhoff se presenta en la infancia con inicio de los síntomas entre los 2-9 meses, e incluye síntomas como debilidad progresiva, déficit cognitivo, compromiso visual y auditivo, convulsiones y muerte, usualmente antes de los 3 años. Se han descrito formas de aparición tardía, las cuales son infrecuentes e incluyen un amplio espectro de alteraciones neurológicas entre ellas ataxia espino-cerebelar, enfermedades de la neurona motora, neuropatía sensorial y motora, tremor, distonía y psicosis (Sung et al., 2018). Para este fenotipo menos severo se han encontrado mutaciones heterocigotas compuestas, sin embargo, el mecanismo fisiopatológico por el cual estas variantes producen este fenotipo es desconocido.

Variante HPS5 NP_852608.1 p.Pro846Leu

Mutaciones en el gen *HSP5* se han asociado al Síndrome Hermansky-Pudlak tipo 5, una entidad autosómica recesiva caracterizada por albinismo oculocutáneo y diátesis hemorrágica (Huizing et

al., 2021). La variante ha sido reportada previamente en ClinVar (rs144875223) y es considerada como benigna. El fenotipo no es compatible con los hallazgos de la paciente.

Variante MAN2B1 NP_000519.2 p.Pro282Ser

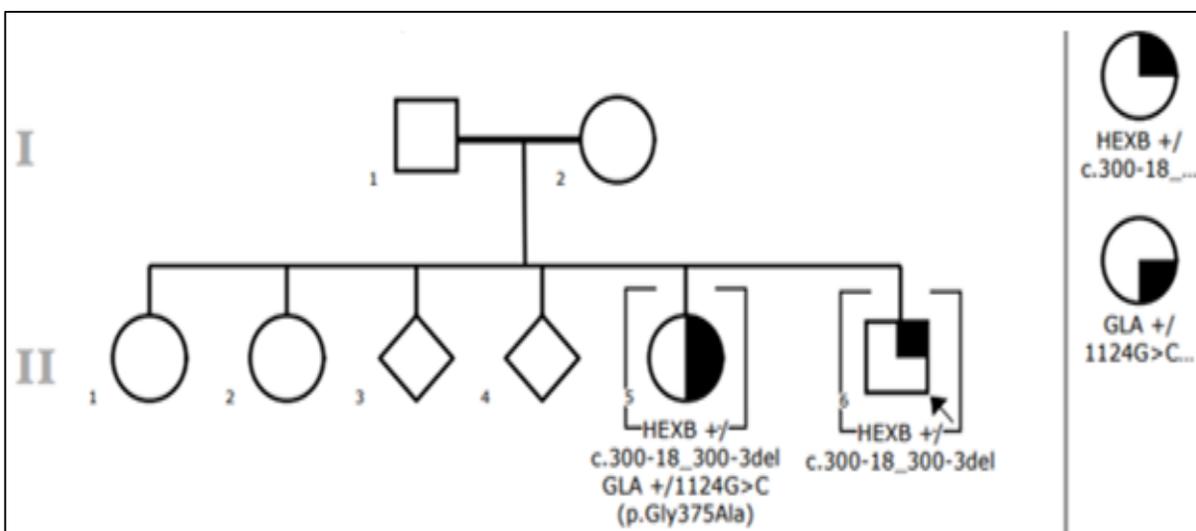
Mutaciones en el gen *MAN2B1*, codificante para una enzima que hidroliza los residuos de alfa-D-manosa, se han relacionado con alfa manosidosis en su forma infantil, entidad con herencia autosómica recesiva. Esta condición genética produce una acumulación de glucoproteínas en el sistema nervioso y el hígado. Los pacientes afectados por esta entidad presentan un fenotipo “hurleriano”, retraso psicomotor, disostosis múltiple, hepatoesplenomegalia, hipoacusia y opacidad corneal (Borgwardt et al., 2015). La variante *MAN2B1* c.844C>T (p.Pro282Ser) ha sido reportada previamente (rs45576136) y aunque existen interpretaciones conflictivas de patogenicidad según ClinVar, al menos un estudio la reporta como potencialmente benigna (Riise et al., 2012). El fenotipo no es compatible con los hallazgos de la paciente.

Los resultados de la actividad enzimática de hexosaminidasa y alfa galactosidasa se presentan a continuación.

Tabla 7.
Resultados actividad enzimática

Actividad enzimática	Valores Paciente	Valores control
Hexosaminidasa total	303 nmol/h/mg	360 nmol/h/mg
Hexosaminidasa A	71.8%	57.9%
Hexosaminidasa B	57.1 nmol/h/mg	155.30 nmol/h/mg
Alfa galactosidase	15.45 nmol/h/mg	24.21 nmol/h/mg

Los niveles enzimáticos se encuentran dentro de lo normal, ya que, según la literatura, las enfermedades de depósito lisosomal se presentan cuando la actividad enzimática es menor del 25 al 30% cuando se comparan con un control normal. A partir de la información recopilada durante la anamnesis y los resultados obtenidos de los estudios moleculares, se construye árbol genealógico, que se presenta a continuación en la figura 5.

Figura 5.*Árbol genealógico de hermanos con mutaciones heterocigotas*

Discusión

La ley 1098 del año 2006 por la cual se expidió el “Código de la Infancia y la Adolescencia” en el Artículo 1° dice: “Finalidad. Este código tiene por finalidad garantizar a los niños, a las niñas y a los adolescentes su pleno y armonioso desarrollo para que crezcan en el seno de la familia y de la comunidad, en un ambiente de felicidad, amor y comprensión. Prevalecerá el reconocimiento a la igualdad y la dignidad humana, sin discriminación alguna”. En el Artículo 2°. expresa: “Objeto. El presente código tiene por objeto establecer normas sustantivas y procesales para la protección integral de los niños, las niñas y los adolescentes, garantizar el ejercicio de sus derechos y libertades consagrados en los instrumentos internacionales de Derechos Humanos, en la Constitución Política y en las leyes, así como su restablecimiento.

Dicha garantía y protección será obligación de la familia, la sociedad y el Estado”. En la misma ley, en el Artículo 36, se expresa. “Derechos de los niños, las niñas y los adolescentes con

discapacidad. Para los efectos de esta ley, la discapacidad se entiende como una limitación física, cognitiva, mental, sensorial o cualquier otra, temporal o permanente de la persona para ejercer una o más actividades esenciales de la vida cotidiana. Además de los derechos consagrados en la Constitución Política y en los tratados y convenios internacionales, los niños, las niñas y los adolescentes con discapacidad tienen derecho a gozar de una calidad de vida plena, y a que se les proporcionen las condiciones necesarias por parte del Estado para que puedan valerse por sí mismos, e integrarse a la sociedad.

Asimismo: 1. Al respeto por la diferencia y a disfrutar de una vida digna en condiciones de igualdad con las demás personas, que les permitan desarrollar al máximo sus potencialidades y su participación activa en la comunidad. 2. Todo niño, niña o adolescente que presente anomalías congénitas o algún tipo de discapacidad, tendrá derecho a recibir atención, diagnóstico, tratamiento especializado, rehabilitación y cuidados especiales en salud, educación, orientación y apoyo a los miembros de la familia o a las personas responsables de su cuidado y atención (Pineda et al., 2018).

La adopción en Colombia es una figura jurídica mediante la cual por decisión voluntaria de una persona o pareja se crea, mediante el consentimiento, un vínculo de parentesco con el adoptante, surgiendo así entre ellos una relación de paternidad y maternidad que produce todos los efectos jurídicos. En Colombia, los niños en proceso de adopción son protegidos de manera especial por el estado, particularmente cuando estos traen alguna condición genética (Abtahi et al., 2022).

Fue llamativo el hecho de que una pareja de hermanos fuera remitida para su diagnóstico cuando el desempeño clínico y neurológico de ambos era muy distinto al esperado para una persona con NPC, debido a que quienes sufren este padecimiento se caracterizan por presentar una afección clínica bastante florida determinada por degeneración neuronal grave, deterioro cognitivo,

trastornos del comportamiento, convulsiones, movimientos oculares anormales, disfagia, disartria, distonía, hepatomegalia y ataxia (Okada et al., 1995).

Un niño aparentemente sano con historia familiar de una hermana mayor afectada con NPC fue quien primero llegó consulta y, debido al antecedente familiar con pocos datos personales y de historia parental, se le realizó un exoma de diagnóstico, mediante un panel customizado de 354 genes que incluyó todos los implicados en la enfermedad de Niemann Pick, así como para otras enfermedades neurológicas y metabólicas hereditarias que pudieran ser diagnósticos diferenciales de (NPD), esto con el fin de acortar los tiempos de diagnóstico para hacer efectiva la protección del estado y su eventual adopción. El panel multigénico no mostró mutaciones en el ADN para ninguno de los genes implicados en la enfermedad de Niemann Pick tipo C (*NPC1* y *NPC2*), ni para las variantes *NPD-A* y *NPD-B* de la misma enfermedad, lo que permitió excluir en el niño el diagnóstico de enfermedad de Niemann Pick. Por el contrario, se le identificó como portador (sano) de una variante en estado heterocigoto en el gen *HEXB*, con lo cual surgió la pregunta si la hermana mayor, medicada con miglustat tenía NPC o estaba con un mal diagnóstico.

La evaluación clínica de los dos hermanos no mostró ni respaldó ningún hallazgo neurológico o conductual. Cabe destacar que la paciente del Caso 2 no presentó ningún signo o síntoma común de NPC1; en cambio, mostró un buen desempeño escolar y social. Para esta paciente, el diagnóstico previo de NPC1 y el tratamiento con miglustat solo se respaldaron con una prueba de filipina positiva, que aún es considerada como el Gold estándar para el diagnóstico de pacientes con NPC (representa un aumento de las moléculas de colesterol LDL no esterificado lisosomal o una disminución citoplásmica del colesterol LDL esterificado en células cultivadas de piel de fibroblastos). Aunque el test de Filipino es una herramienta eficiente (sensibilidad y especificidad)

para el diagnóstico de pacientes con NPC, depende en gran medida de las condiciones técnicas del ensayo de laboratorio. De hecho, se ha informado que en aproximadamente el 15% de los casos, la prueba de Filipino no es concluyente y puede necesitar una confirmación adicional mediante otras técnicas de diagnóstico o la secuenciación del gen *NPC1*.

No fue claro el motivo por el cual la paciente del caso 2 llevaba 3 años recibiendo manejo farmacológico con miglustat; ya que este medicamento solo ha recibido autorización de comercialización en Europa y en otros países únicamente para el tratamiento específico de las manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Gaucher tipo 1 y la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (Kolter et al., 2009), las cuales no estuvieron presentes en esta niña. La administración de este medicamento, hizo que la menor mantuviera en un estado social de adoptabilidad más bajo (menos elegible para ser adoptada), esto debido a que el miglustat está designado como medicamento huérfano y de alto costo, según la Comisión Nacional de Medicamentos y Dispositivos Médicos de Colombia. Para el 2022, el precio mensual del tratamiento con miglustat es de USD 4.655 o \$18.620.000 (Vitales, 2022).

En los dos casos, tanto el WES de diagnóstico como el análisis comprensivo mediante un panel de genes multigénicos lisosomales no mostraron ni identificaron ninguna mutación en el gen *NPC1*. La mayoría de las variantes publicadas en el gen *NPC1* son mutaciones *missense*, *nonsense* o de delección pequeña; con el análisis WES no se identificaron tampoco variaciones en la región promotora o intrónica genética (Abtahi et al., 2022), descartándose el diagnóstico de *NPC1*. En consecuencia, después de la sesión de asesoramiento genético, se suspendió el tratamiento con miglustat y se reestableció para la niña el estado de adoptabilidad, siendo más elegible para adopción.

Las mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas del gen *HEXB* están relacionadas con la enfermedad de Sandhoff. Las mutaciones en el gen *HEXB* conducen a una acumulación de gangliósido GM2 en las neuronas y provocan un trastorno neurodegenerativo denominado gangliosidosis GM2. Los pacientes con ES muestran una neurodegeneración progresiva, con debilidad, déficit cognitivo, convulsiones, discapacidad visual, pérdida de la agudeza auditiva y muerte en la mayoría de los casos antes de los 3 años (Okada et al., 1995). Ninguno de los cuadros clínicos de ES estaba presente en los niños. La variante identificada y reportada como hallazgo incidental, en estado heterocigoto, es nueva y se encuentra en un sitio aceptor de splicing, esto identificado al realizar el análisis in silico con el software SpliceAI (Breiden y Sandhoff, 2019), el cual informó una puntuación de 0,94 (alta precisión >0,8), para la pérdida del sitio aceptor de empalme, lo que sugiere que esta variante de ADN es probablemente patogénica. Sin embargo, ambos hermanos tienen estado de portador heterocigoto para *HEXB* c.300-18_300-2.

En el caso 2 se identificó un nuevo hallazgo incidental conocido, en estado heterocigoto y anotado como *GLA* c.1124G>C (p.Gly375Ala), (rs869312164), que es patogénico según ClinVar. La prueba in vitro de esta variante ha mostrado una actividad enzimática residual de 44,1% ± 10,1 (Wang et al., 2007). Las mutaciones en el gen *GLA* causan la enfermedad de Fabry (EF), que es una condición lisosomal recesiva ligada al cromosoma X y causada por la deficiencia de la enzima alfa galactosidasa. Los hombres se ven afectados clásicamente y, en ocasiones, las mujeres son levemente sintomáticas. La globotriaosilceramida es un glicoesfingolípido presente en todo el organismo pero que se acumula en la EF, principalmente en el interior de las células de los vasos sanguíneos, el sistema nervioso, el corazón, los riñones y la piel (Kolter et al., 2009).

Las mutaciones heterocigotas *HEXB* y *GLA* fueron hallazgos incidentales en ambos hermanos, lo que amplía la pregunta sobre la actividad enzimática de hexosaminidasa y alfa galactosidasa. El caso 1 fue entregado para la adopción previamente a ser muestreado para estados dos enzimas y no estuvo disponible para análisis posteriores.

En el caso 2, las actividades enzimáticas de hexosaminidasa (A, B y total) y alfa galactosidasa estaban levemente disminuidas; específicamente, la actividad HexB, la cual mostró una reducción del 63%, lo que puede explicarse por el hallazgo de la variante heterocigota y la actividad residual se cuantificó en el 37%, lo que es compatible con una vida normal. Se ha informado ampliamente que niveles superiores al 10% de una enzima son suficientes para tener un fenotipo atenuado o normal (Lemieux et al., 2006). Como resultado, el estado de salud de la niña se consideró normal y se suspendió el miglustat, se descartó el diagnóstico de NPC1 y mejoró su nivel de adoptabilidad, de hecho, fue adoptada solo tres meses después a los 11 años de edad.

Las enfermedades metabólicas muestran una variación clínica considerable en la severidad de los síntomas que puede atribuirse a efectos diferenciales de mutaciones específicas en la función de genes/enzimas que hacen inexacta la correlación genotipo/fenotipo, ya sea por factores modificantes o epigenéticos o porque concurren en su acción en más de una vía o en múltiples pasos de una vía metabólica.

Este estudio muestra cómo un análisis NGS ayudó rápidamente a resolver un diagnóstico erróneo de enfermedad lisosomal en una pareja de hermanos, uno de ellos que había sido diagnosticado con NPC1. El hermano menor sano se vio afectado en su proceso de adopción por el diagnóstico de NPC1 de su hermana y el tratamiento con miglustat de alto costo; ambos no eran elegibles para la adopción. El análisis NGS rechazó el diagnóstico de NPC1 y los hallazgos incidentales de NGS

para dos enfermedades lisosomales se aclararon con el análisis clásico de actividad enzimática. El análisis de ADN molecular, la actividad enzimática y el asesoramiento genético restauraron para estos niños un estado de adaptabilidad. Sugerimos que el análisis de ADN confirmatorio de mutación debe ser un estándar para todos los pacientes bajo sospecha de enfermedad NPC1.

Capítulo II.

La Identificación de un Fenotipo Intermedio y Penetrancia Incompleta para una Enfermedad Neurológica Rara

La neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (NBIA) se refiere a un grupo de trastornos neurológicos progresivos, monogénicos de origen genético, en los que se acumula hierro de manera anormal en los gánglios basales, el globo pálido y la sustancia negra, aunque también puede afectar otras áreas como la corteza cerebral y el cerebelo, que se visualizan mediante la toma de neuroimágenes y la realización de estudios histopatológicos. NBIA afecta a adultos y niños con una incidencia de 1:1.000.000 (Hayflick et al., 2018).

Los afectados presentan una combinación de signos piramidales y extrapiramidales como distonía de inicio temprano, parkinsonismo, ataxia, convulsiones, neuropatía retiniana por atrofia óptica y degeneración retiniana. La mayoría de los casos tienen un nivel de inteligencia normal, pero se informan trastornos del comportamiento e incluso demencia (Wiethoff y Houlden, 2017). La clínica de los pacientes que padecen acumulación de hierro intracerebral parece estar asociada a la producción de radicales libres, que induce a ferroptosis (un tipo de muerte celular programada dependiente de hierro con acumulación de peróxidos lipídicos), así como a procesos inflamatorios crónicos con infiltración de células inmunitarias que producen degeneración y muerte de las neuronas y de las células gliales (Huo et al., 2019).

NBIA presenta heterogeneidad genética y distintos modos de herencia, autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X (Meyer et al., 2015). Hasta el momento se han identificado 15 genes causales de los trastornos pertenecientes al grupo NBIA; dos de ellos, *CP* y *FTL1*, se encuentran relacionados directamente con la homeostasia del hierro, mientras que los

genes *PANK2*, *COASY*, *PLA2G6*, *C19orf12*, *FA2H*, *ATP13A2*, *DCAF17*, *SCP2*, *GTPBP2*, *AP4M1*, *REPS1* y *CRAT* están involucrados en diferentes rutas metabólicas (Levi y Tiranti, 2019).

En el siguiente cuadro se relacionan los genes y subtipos de NBIA, indicando la patología asociada, el patrón de herencia y las manifestaciones clínicas típicas de cada uno (ver Tabla 8).

Tabla 8.
Genes NBIA asociados a una patología y su fenotipo

GEN	FUNCIÓN	MANIFESTACIONES CLÍNICAS
PATOLOGÍA		
HERENCIA		
<i>C19orf12</i>	Desconocida, se cree que tiene que ver con el metabolismo de los lípidos y remodelación de membranas	Hierro depositado en el globo pálido y la sustancia negra. Presencia de abundantes cuerpos de Lewy. Retraso global del desarrollo, distonía, parkinsonismo, síntomas psiquiátricos y paraparesia espástica
Neurodegeneración asociada a proteínas de membrana mitocondrial (MPAN)		
AR		

<i>PC</i>	Oxidación de hierro	Hierro depositado en los ganglios basales, hígado, páncreas y miocardio.
Aceruloplasminemia		Trastornos del movimiento, demencia, disartria, ataxia
AR		y degeneración de la retina
<i>FTL1</i>	Almacenamiento del hierro celular	Hierro depositado en los ganglios basales, cerebelo y corteza motora.
Nueroferritopenia		Atrofia cerebral y cerebelosa.
AR		Cavitación del putamen.
		Trastornos del movimiento extrapiramidal
		Distonía, parkinsonismo y disartria
PANK2	Fosforilación de pantotenato, síntesis de coenzima A	Hierro depositado en globo pálido con signo del ojo del tigre en neuroimágenes.
		Distonía, espasticidad, deterioro cognitivo y retinopatía pigmentaria

Neurodegeneración asociada

a pantotenato quinasa

(PKAN)

AR

COASY

Síntesis de coenzima A

Hierro depositado en el globo pálido.

Neurodegeneración asociada

a proteínas

Distonía oro-mandibular, disartria,
paraparesia espástico-distónica y

comportamiento obsesivo

compulsivo

AR

PLA2G6

Hidrólisis de enlaces éster en
la posición sn 2 de
fosfolípidos.

Hierro depositado en el globo
pálido en el <50% de los casos.

Neurodegeneración asociada

a PLA2G6

Remodelación de membranas

Distrofia neuro axonal,

hipotonía, ataxia y atrofia

cerebelosa, distonía, espasticidad y

parkinsonismo en la edad adulta

AR

<i>FA2H</i>	Hidroxilación de ácidos grasos,	Hierro depositado en el globo pálido y la sustancia negra.
Neurodegeneración asociada a la hidroxilasa de ácidos grasos	Síntesis de ceramidas. Formación de mielina.	Ataxia profunda, distonía, disartria, cuadriplejía espástica, hipotonía axial y atrofia óptica
AR		
<i>SCP2</i>	Actividad de tiolasa para la ruptura de ácidos grasos de cadena ramificada.	Hierro depositado en el tálamo. Distonía y tortícolis espasmódica, ataxia espinocerebelosa con deterioro del equilibrio y de la marcha
Leucoencefalopatía con distonía y neuropatía motora		
AR		
<i>CRAT</i>	Oxidación de carnitina acetiltransferasa	Hierro depositado en el globo pálido y la sustancia negra.
AR		

		Degeneración espinocerebelosa, atrofia cerebelosa y leucodistrofia posterior.
<i>WDR45</i>	Interacción proteína-proteína.	Hierro depositado en el globo pálido y la sustancia negra.
Neurodegeneración asociada a hélice β (BPAN)	Formación temprana de autofagosomas	Retraso global del desarrollo, deterioro neurológico, distonía, parkinsonismo, deterioro cognitivo y convulsiones
Ligada a X		
<i>ATP13A2</i>	Bomba de cationes lisosomales y formación de autofagosomas	A menudo no hay sobrecarga de hierro.
Enfermedad de Kufor-Rakeb (KRS)		Parkinsonismo temprano, signos piramidales, alteración de movimientos oculares y demencia
AR		
<i>AP4M1</i>	Formación de vesículas	Hierro en globo pálido reportado en una sola familia.
AR		

		Retraso del desarrollo de inicio temprano, deterioro de la función motora, tetraparesia y discapacidad intelectual.
<i>REPS1</i>	Endocitosis y transporte de vesículas	Acumulación de hierro en el globo pálido y la sustancia negra y pedúnculos cerebrales.
AR		Hipotonía del tronco, ataxia cerebelosa progresiva, síndrome piramidal, atrofia cerebral y cerebelosa.
<i>DCAF17</i>	Desconocida	A veces acumulación de hierro en el globo pálido y la sustancia negra.
Síndrome de Woodhouse-Sakati (WSS)		Síntomas extrapiramidales, distonía, deterioro cognitivo, hipogonadismo, alopecia y diabetes mellitus
AR		

<i>GTPBP2</i>	Desconocida, se cree que está relacionada con la estabilidad de los ribosomas	Hierro depositado en el globo pálido y la sustancia negra.
AR		Atrofia cerebelosa, retraso mental, ataxia y distonía

Nota: Levi S, Tiranti V. (2019). Neurodegeneration with brain iron accumulation disorders: Valuable models aimed at understanding the pathogenesis of Iron deposition.

Este capítulo está relacionado con una familia afectada por neurodegeneración por depósito de hierro (NBIA), asociada a defectos de las proteínas de la membrana mitocondrial (MPAM), en donde ocurre una alteración en la homeostasia del hierro, ocasionada por mutaciones en el gen *C19orf12*, (NM_001031726.3), que corresponde a una secuencia de ADN con un marco de lectura abierto, numerado 12 y ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 (*C19orf12*; 19q13.11), del cual no se conoce una función clara, pero se cree que está relacionada con el metabolismo de los lípidos, en la función mitocondrial y el metabolismo de la coenzima A, que es un transportador del grupo acilo (The GeneCards, 2014; Levi y Tiranti, 2019). Los grupos acilo juegan un papel muy importante en procesos catabólicos como la oxidación de ácidos grasos y procesos anabólicos como la síntesis de lípidos de la membrana. La alteración en los procesos mencionados anteriormente afecta la homeostasis celular del hierro en el tejido cerebral, generando depósitos anormales que conducen a un daño neurológico por muerte neuronal.

Este tipo de trastorno generalmente comienza en la infancia, aunque se puede presentar en la adultez. Es muy común que las personas que lo padecen presenten alteraciones en el movimiento,

distonía, espasticidad y trastornos psiquiátricos, dentro de los que se describen labilidad emocional, cuadros de ansiedad, trastornos depresivos e impulsividad. Estos pacientes con frecuencia llegan a la postración, con pérdida de control de esfínteres, deterioro cognitivo severo y demencia (Maccarinelli et al., 2015).

El abordaje de un paciente en quien se sospecha NBIA consiste en la realización de una valoración completa que incluya una historia familiar detallada, se debe indicar la toma de resonancia nuclear magnética del cerebro, la valoración por neurología y oftalmología, y priorizar el estudio molecular de genes relacionados con esta condición.

Ninguna de las patologías incluidas dentro del grupo NBIA tiene tratamiento específico, pero es de suma importancia que reciba manejo interdisciplinario con el objetivo de reducir el grado de discapacidad y mejorar la calidad de vida de quienes la padecen.

El presente estudio muestra la heterogeneidad clínica y la correlación entre el genotipo y el fenotipo en un grupo familiar afectado con NBIA del tipo 4 (NBIA4), con múltiples enfermos que se presentaron dentro de la misma parentela; se describen, tanto la forma autosómica dominante que ha sido pobremente descrita en la literatura, como la forma autosómica recesiva que es ampliamente conocida como el tipo clásico de NBIA4.

Presentación de Casos Clínicos

Caso 1: II 4

El caso índice es una mujer de 25 años, referida como sana hasta los 5, quien debutó con episodios repetidos de irritabilidad, alucinaciones visuales y cambios en el comportamiento. En adición, presentó episodios repetidos de pérdida del estado de conciencia sin movimientos anormales ni relajación de esfínteres o mordedura de la lengua. En la noche presentaba terrores nocturnos y sonambulismo. A los 7 años, le diagnosticaron un trastorno bipolar y recibió carbamazepina, risperidona y difenhidramina con mejoría de los síntomas comportamentales y las alucinaciones. A esa misma edad presentó el primer intento de suicidio junto con episodios de agresividad marcada hetero dirigida. A los 8 años, presentó movimientos extrapiramidales que se atribuyen a la administración de risperidona. La resonancia nuclear magnética cerebral mostró neurodegeneración asociada a la acumulación de hierro intracerebral (Figura 6). Se realizó un estudio molecular en el ADN para trastornos del movimiento (enfermedad de Párkinson, distonía y enfermedad de Huntington), que se informaron negativos. Actualmente es una persona dependiente para la mayoría de las actividades de la vida diaria (escala de Barthel <20 o dependencia total), recibe toxina botulínica y propanolol a dosis de 20mg cada 12 horas. Se encuentra confinada a una silla de ruedas, es incapaz de asumir bipedestación, presenta hipotonía generalizada e hiporreflexia, distonía distal con síntomas cognitivos y comportamentales dados por ánimo triste y labilidad emocional, además de disartria y pérdida de control de esfínteres.

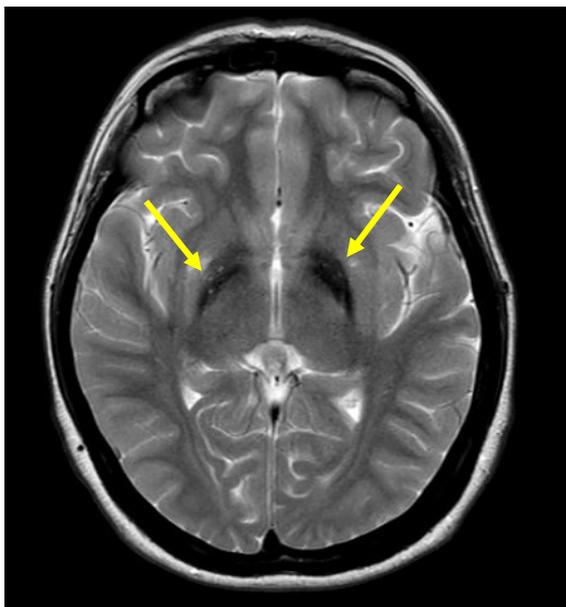


Figura 6.
RNM de cerebro paciente caso índice con imágenes en los ganglios basales, que corresponden a depósitos de hierro



Figura 7.
Foto de paciente caso índice, autorizada por sus progenitores

Caso 2: II 3

Es una mujer de 29 años y hermana del caso índice, quien debutó a los 18 con proctalgia severa, rectorragia con diagnóstico de proctalgia fugaz y neuralgia del nervio coccígeo; además, refiere presentar dermatitis de contacto en palmas y en pliegues, así como cuadros esporádicos de ansiedad. Esta persona comenta que requiere de la administración frecuente de analgésicos para el manejo de dolor referido. Al momento de su valoración se encontraba tranquila, orientada, sin alteración en la esfera mental, sin signos de focalización neurológica ni otra alteración al examen físico y la resonancia nuclear magnética del cerebro fue reportada como normal (Figura 8).

Caso 3: II 5

Es una mujer de 19 años, hermana del caso índice, quien desde los 11 presenta dolor abdominal recurrente y de difícil manejo, que ha requerido observación intrahospitalaria en varias oportunidades al confundirse con un cuadro abdominal agudo de manejo quirúrgico. Desde la adolescencia es atendida por parte de psiquiatría por un trastorno de ansiedad y depresión. Comenta tener episodios de cefalea global intensa que en ocasiones se acompaña de lipotimia, crio diaforesis y sensación de palpitaciones; acusa tener parestesias en la cara y las manos, así como dorsalgia y dolor en articulaciones pequeñas. La resonancia nuclear magnética del cerebro fue informada como normal. Al examen físico se encontró sin labilidad afectiva, sin alteraciones en su esfera mental, sin ideas de auto o hetero agresión, con un examen físico sin alteraciones.

(Figura 8)

Caso 4: I 3

La madre tiene 50 años y se refiere como normal (Figura 8).

Caso 5: I 2

El padre tiene 61 años, refiere presentar con frecuencia reacciones alérgicas con manifestaciones cutáneas, además de labilidad afectiva, ansiedad y, en ocasiones, impulsividad. Se encuentra sin alteraciones evidentes en el examen físico y sin otras alteraciones en la esfera mental. El padre tiene dos hijos de una unión anterior, que actualmente tienen 37 (caso 6) y 32 (caso 7) años (Figura 8).

Caso 6: II 1

Hombre de 37 años quien presenta cefaleas ocasionales sin pérdida del estado de conciencia ni alteraciones de la sensibilidad o de la fuerza, ni movimientos anormales, ni alteraciones en la marcha, sin otro síntoma referido. En adición, no se encontraron alteraciones en el examen físico (Figura 8).

Caso 7: II 2

Hombre de 32 años con antecedente de tabaquismo, quien ha presentado episodios de ansiedad que requirieron intervención profesional para su manejo. Al momento de la valoración niega cambios comportamentales o labilidad afectiva, no refiere ideas de auto o hetero agresión, u otros síntomas, ni se encontraron alteraciones en el examen físico. Comenta que tiene una hija adolescente que presenta labilidad emocional con tendencia a la depresión. (Figura 8).

Caso 8: III 1

Adolescente de sexo femenino de 13 años e hija del paciente del caso 7. Según el padre, la joven presenta labilidad afectiva con ánimo triste, no refiere ideas o gestos de auto o hetero agresión y presenta un buen desempeño escolar. No se evidenciaron alteraciones en el examen físico ni en la esfera mental, ni déficit neurológico. (Figura 8).

Caso 9: III 10

Paciente de 28 años, sobrina de la paciente del caso 4. Se refiere como sana y en quien no se encuentran alteraciones en el examen físico. Tiene 2 hijos nacidos por parto normal, comenta que

como fruto de su primera gestación nació una niña, quien actualmente tiene 3 años y presenta alteraciones en el comportamiento y trastorno del aprendizaje, además de auto agresión ante la imposición de límites, pobre lenguaje verbal, sin control de esfínteres. Refiere que su segundo hijo tiene 2 años y hasta el momento se encuentra sano. (Figura 8).

Caso 10: III 6

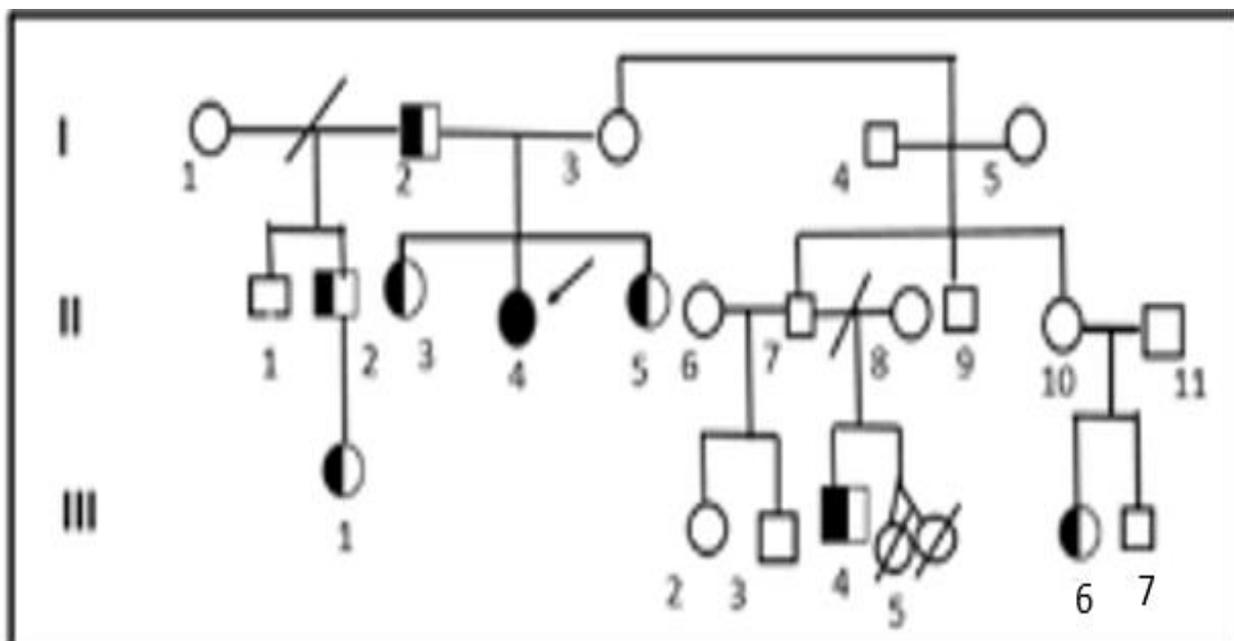
Niña preescolar de 3 años de edad, nacida por parto vaginal eutócico a término, con adecuado peso y talla para la edad, al parecer buen APGAR, con alojamiento conjunto materno, quien según refiere la madre (caso 9), presentó un desarrollo psicomotor normal hasta aproximadamente los 2 años, edad en la que evidencian alteraciones en el comportamiento, dados por irritabilidad, auto agresión, trastornos del aprendizaje e incapacidad para seguir órdenes. Adicionalmente, comenta la madre que la menor ha perdido el control de esfínteres y tiene pobre lenguaje verbal. Al examen físico se torna irritable, difícilmente consolable, con aspecto fenotípico normal y no se observa déficit neurológico focal. (Figura 8).

Caso 11: III 4

Se trata de un joven de 13 años, sobrino de la paciente del caso 9. Es el producto de primer embarazo de padres no consanguíneos, nacido por cesárea. Los padres refieren que su neurodesarrollo fue normal y en el momento cursa sexto grado con buen rendimiento escolar. Comentan sus padres que desde los 5 años ha presentado comportamiento irritable, labilidad afectiva y episodios de agresividad hetero dirigida. Al examen físico se evidencia ptosis palpebral

izquierda y disfemia, con el resto de examen físico normal, sin déficit neurológico focal, ni alteración en la esfera mental (Figura 8).

Figura 8.
Genealogía familia afectada NBIA



Estudios Moleculares

Estudio de exoma dirigido para enfermedad neurodegenerativa

Metodología

El DNA genómico fue extraído de la muestra clínica (sangre venosa) con anticoagulante EDTA a partir de la cual se preparó una librería genómica utilizando los protocolos de Illumina con enriquecimiento en las regiones codificantes del genoma (exoma) utilizando hibridación y captura. La secuenciación fue realizada usando un equipo Illumina NovaSeq 6000. Las lecturas obtenidas fueron mapeadas y comparadas con el genoma de referencia (hg19) y el llamado de variantes fue realizado utilizando la aplicación GATK v4.0.5.1. Las variantes obtenidas fueron anotadas y analizadas utilizando el software VarSeq v2.2.1. Procesos de filtrado y análisis permitieron incluir variantes en regiones exónicas y los sitios adyacentes a las regiones de corte y empalme del genoma (*splicing*).

Los análisis genómicos se iniciaron a partir de un estudio de exoma (WES) en algunos de los miembros de la familia (**casos 1 al 5**), en el que se incluyó el análisis de un panel comprensivo de genes relacionados con neurodegeneración con depósito de hierro: *ATP13A2*, *C19orf12*, *COASY*, *CP*, *DCAF17*, *FA2H*, *FTL*, *PANK2*, *PLA2G6* y *WDR45*.

Análisis molecular del gen *C19orf12*

Metodología

Se realizó secuenciación de Sanger en cada uno de los miembros de la familia, hubo dificultades para la toma de la muestra de la paciente del caso 10, por lo que incluyó a la madre, por ser de interés la clínica actual de la menor. En todos los casos a partir de una muestra de sangre venosa se efectuó extracción de ADN genómico total por técnicas convencionales. Se amplificó por PCR la región codificante completa, las uniones intrón-exón y 343 pares de bases de la región promotora del gen *C19orf12*(ENST00000392278.2) en el exón 3. El amplicón fue purificado por medio de fosfatasa alcalina y exonucleasa I, y secuenciado directamente en la totalidad de su longitud. La secuencia de cada paciente fue comparada con la secuencia de referencia. La numeración de los nucleótidos se inició con respecto a la primera adenina (A) del codón de inicio ATG en la posición 1. Se diseñaron *primers* para flanquear la región en la cual se identificó la mutación.

Se realizó el diseño de los primers de amplificación del exón 3 con la herramienta bioinformática PRIMER3 (v. 0.4.0) usando como Tann 60°C.

Los primers y las condiciones de PCR estandarizadas se indican en la Tabla 9.

Tabla 9.

Condición y primers exón 3 gen C19orf12

EXON	PCR		CONDICIONES	
	Primer Froward	Primer Reverse	Tm	Extensión
1	TTTTACAGTAAGCCCAGAAACCTC	GTAATTTCTGGAACATGACACTGC	60	45

Resultados

Al realizar la valoración clínica de la paciente del caso índice y sus familiares directos e indirectos, se encontraron síntomas que llamaron la atención, al ser compartidos por 2 o más miembros de la familia, como el dolor de aspecto neuropático y las manifestaciones cutáneas tipo dermatitis, así con trastornos del habla tipo disfemia presentado solo por un miembro de la familia; ninguno de estos síntomas se encuentra reportados dentro del cuadro clínico de NBIA asociada a proteínas de membrana.

En el siguiente cuadro se presentan las manifestaciones clínicas de los miembros de la familia analizada (ver Tabla 10)

Tabla 10.
Manifestaciones clínicas de grupo familiar con NBIA

CASOS PACIENTES VALORADOS											
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Labilidad /emocional	x					x		x			x
Depresión	x		x								
Ansiedad		x						x			

Impulsividad	x	x	X	x
Alucinaciones	x			
Distonía	x			
Espasticidad	x			
Deterioro cognitivo	x			
Incontinencia	x		x	
Disartria	x			
Disfemia				x
Dolor		x	x	
Manifestaciones cutáneas		x	x	

El resultado del estudio genético y el análisis bioinformático a partir de datos obtenidos por secuenciación del exoma completo (*Whole Exome Sequencing* -WES-), permitió identificar variantes de secuencia en 88 genes (sinónimos y no sinónimos). Entre ellas, se identificó una variante no sinónima (*missense*) en el caso índice, homocigótica para el gen *C19orf12*, con significancia clínica patogénica y reportada previamente en la base de datos de fenotipos humanos y variaciones de secuencia ClinVar. Adicionalmente, se analizó la variante en el gen *C19orf12* con

los predictores bioinformáticos que la clasifican predictivamente como patogénica en los padres y hermanas en quienes se encontró la misma variante, pero en heterocigosidad.

La secuenciación de Sanger permitió confirmar la variante en el gen *C19orf12* anotada como *C19orf12: c.161G>A p.Gly65Glu*. Para esto se incluyeron otros miembros de la familia como sus medios hermanos, una sobrina y unos primos de la paciente del caso índice. Una segunda variante sinónima fue encontrada en el gen *C19orf12*, anotada como *c.324C>T* en el mayor de los hijos de la primera relación del padre, la cual se clasificó como benigna (ver Tabla 9).

El segundo hijo de la primera relación del padre presentó la misma variante heterocigota en el gen *C19orf12* encontrada en su padre y medias hermanas. El estudio molecular del caso 8, correspondiente a la hija del caso 7, también fue positivo para la variante mencionada, presente en su padre y abuelo paterno.

Los casos 9 al 11 son de la línea materna de la paciente del caso índice. La paciente del caso 9 que fue incluida ante el interés por la clínica de la hija arrojando un resultado *C19orf12: c.161G>A p.Gly65Glu*, el joven del caso 11 también comparte la misma variante que el resto de sus familiares. Ver Tabla 11, y las Figuras de la 9 a la 18.

Tabla 11.
Identificación de variante y análisis bioinformático secuenciación de Sanger

Caso	Gen Identificación	Cambio en DNA	Cambio en Proteína	Cigocidad	Tipo de variante	dbSNP	Patogenicidad
1	<i>C19orf12</i> NM 031448.6	c.161G>A	p. Gly65Glu	Homocigota	<i>Missense</i>	rs752450983	Patogénica
2, 3 4, 5 7, 8 9, 11	<i>C19orf12</i> NM 031448.6	c.161G>A	p. Gly65Glu	Heterocigota	<i>Missense</i>	rs752450983	Patogénica
6	<i>C19orf12</i> NM 031448.6	c.324C>T		Heterocigota	<i>sinónima</i>	rs10424582	Benigna

Figura 9.
Caso 1. Variante homocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A

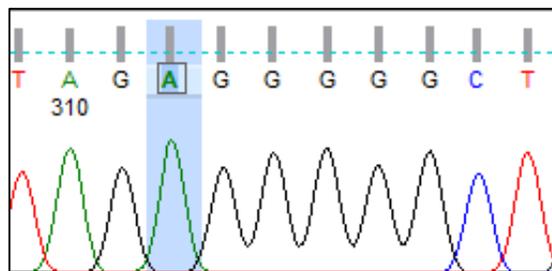
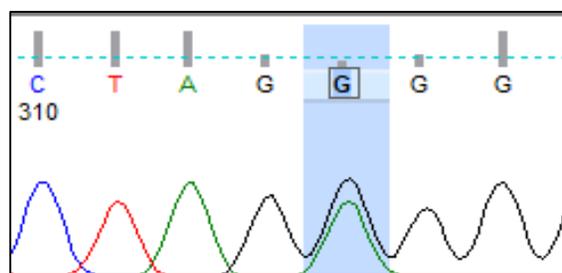
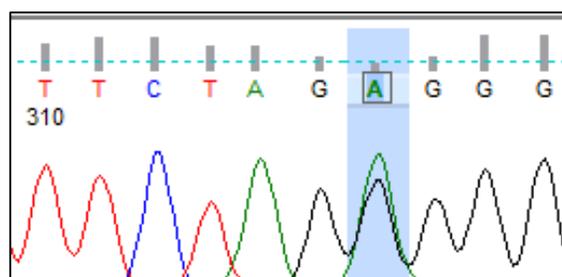


Figura 10.

Caso 2 Variante heterocigota en *C19orf12* exón 3 c.161G>A

**Figura 11.**

Caso 3. Variante heterocigota en *C19orf12* exón 3 c.161G>A

**Figura 12.**

Caso 4. Variante heterocigota en *C19orf12* exón 3 c.161G>AA

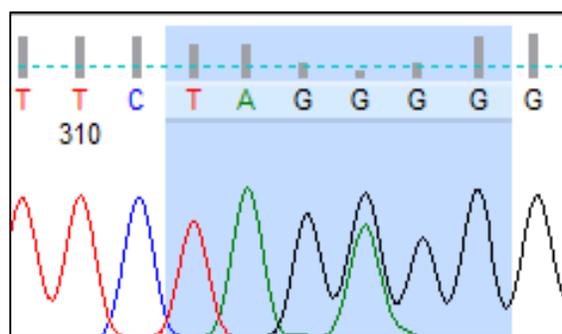
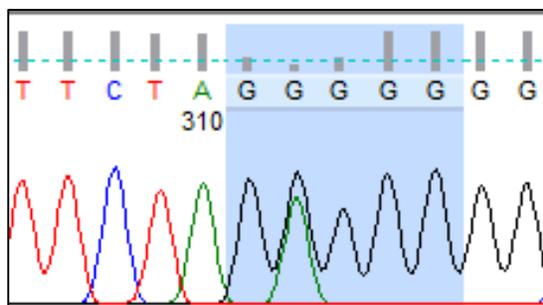
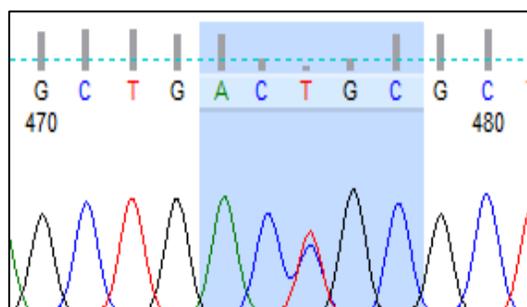


Figura 13.

Caso 5 Variante heterocigota en *C19orf12* exón 3 c.161G>A

**Figura 14.**

Caso 6. Variante heterocigota en *C19orf12* exón 3 c.324C>T

**Figura 15.**

Caso 7. Variante heterocigota en *C19orf12* exón 3 c.161G>A

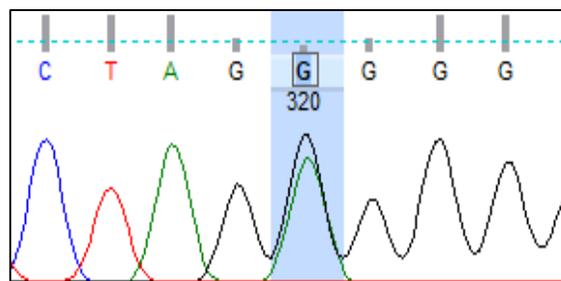
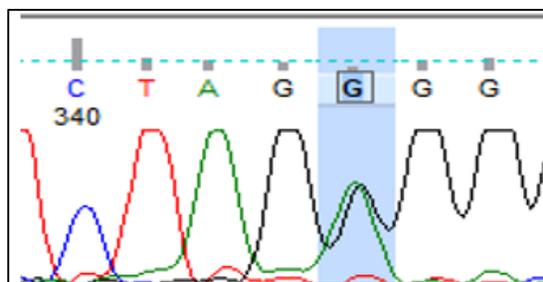
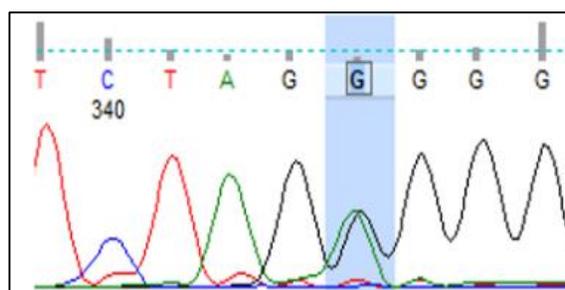


Figura 16.

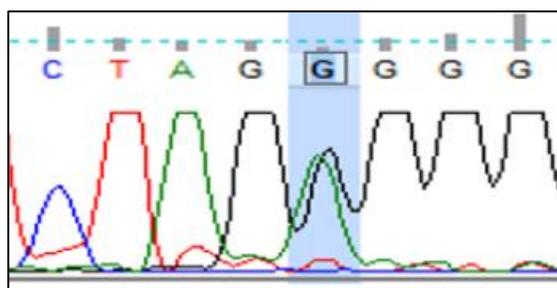
Caso 8. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A

**Figura 17.**

Caso 9. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A

**Figura 18.**

Caso 11. Variante heterocigota en C19orf12 exón 3 c.161G>A

**Discusión**

Los métodos de estudio para condiciones genéticas, tuvieron un gran avance con la aplicación de la medicina genómica, con el cual ha aumentado la precisión en el diagnóstico de los trastornos incluidos en NBIA. No solo se han venido identificando genes y mutaciones causales, sino que,

paralelamente y en forma creciente, se han venido reconociendo la heterogeneidad clínica, la historia natural, los mecanismos patogénicos, la correlación genotipo-fenotipo, los tipos de herencia con los métodos de prevención y algunas opciones terapéuticas.

La heterogeneidad genética plantea el primer reto de caracterizar clínicamente y genéticamente a los afectados con NBIA. Los distintos tipos de NBIA se presentan con diversidad de signos y síntomas neurológicos, alteraciones anatómicas o funcionales del SNC, pero también alteraciones variadas en el comportamiento.

NBIA es una condición genética rara causada por depósitos anormales de hierro en los ganglios basales y la sustancia negra, que pueden demostrarse en la resonancia nuclear magnética cerebral. NBIA cursa con neurodegeneración, signos piramidales y extra piramidales, cambios comportamentales y del estado de ánimo, trastornos de la salud mental y, en algunos casos neuro retinopatía (Hogarth et al., 2013).

En específico, NBIA tipo 4, puede tener un patrón de herencia autosómica dominante o autosómica recesivo (Gregory et al., 2014). Los pacientes homocigotos presentan una forma clásica y severa de la enfermedad, este cuadro clínico por lo general se inicia en la niñez, los síntomas neurológicos son progresivos y debilitantes hasta llegar a la postración, acompañados de síntomas psiquiátricos como labilidad emocional, depresión o psicosis (Maccarinelli et al., 2015). Por otro lado, los pacientes heterocigotos para esta condición en su gran mayoría tienen un fenotipo similar al de los pacientes homocigotos, como se mostró en el estudio realizado a individuos del repositorio OHSU Internacional NBIA, conformado por personas y muestras recolectadas de más de 800 familias en un tiempo de 28 años. En este estudio se observaron varios casos típicos de MPAN por mutaciones

en el gen *C19orf12* en estado heterocigoto con signos y síntomas similares a los informados en la literatura de la forma clásica de la enfermedad (Gregory et al., 2019).

En el presente caso familiar, se identificó una variante patogénica conocida para el gen *C19orf12* mediante el análisis de exoma completo (WES), la cual fue confirmada mediante secuenciación de Sanger. En este grupo familiar se encontró un caso índice, quien se encuentra severamente afectada con la forma clásica de NBIA4, incluyendo las manifestaciones neurológicas y psiquiátricas descritas por otros autores y en quien se identificó la variante patogénica tipo *missense* en estado homocigoto para el gen *C19orf12*: anotada como c.161G>A p.Gly65Glu.

La variante patogénica identificada y anotada como *missense* c.161G>A p.Gly65Glu, reemplaza una G (guanina) por una A (adenina) en la posición 161 de la secuencia codificante del gen *C19orf12* y traduce un cambio en el aminoácido glicina (Gly) por el ácido glutámico (Glu), en el codón 65 de la cadena aminoacídica. Este aminoácido 65 ocupa una posición altamente conservada entre especies, la cual es interpretada con un significado clínico patogénico que se apoya con seis predictores *in silico* de patogenicidad (SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, Mutation Assessor, FATHMM y PROVEAN).

Esta mutación se informa en la base de datos Ensembl y RefSeq (dbSNP: rs752450983), con una frecuencia alélica menor al 1% (MAF<0.01), según gnomAD, lo que indica que los cambios descritos pueden tener un impacto negativo en el fenotipo, dada la baja frecuencia en la población general.

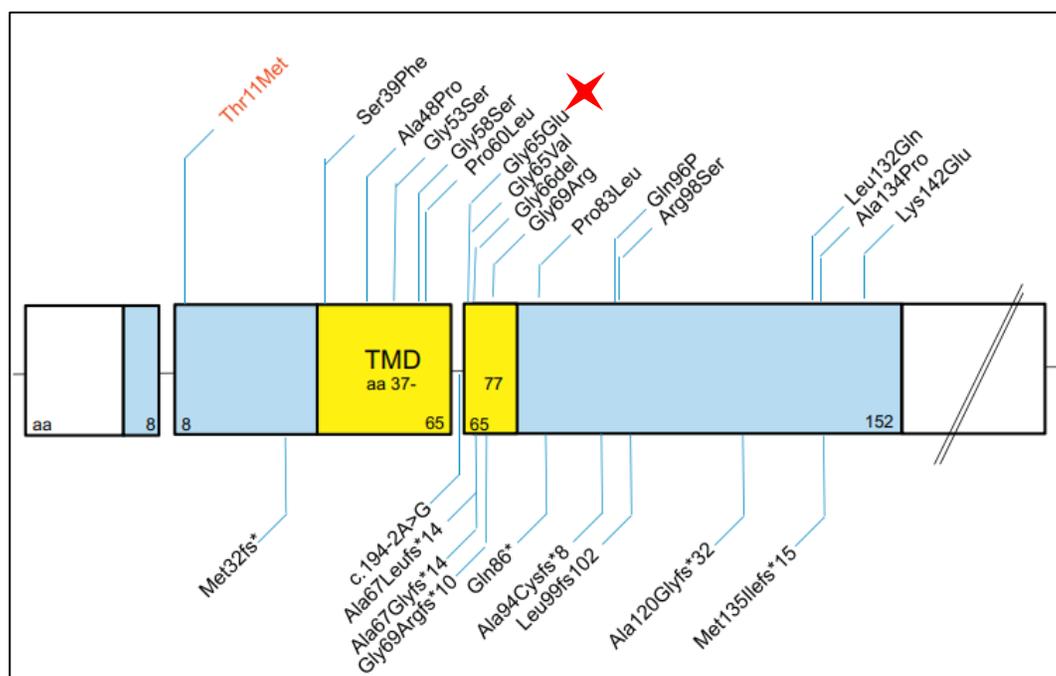
Según la base de datos ClinVar, la importancia clínica es patogénica y está relacionada como causa del Síndrome de Neurodegeneración y Acumulación de Hierro del tipo 4 (NBIA4), que es un tipo

de neurodegeneración asociada a las proteínas de la membrana mitocondrial (MPAM) y se expresa diferencialmente dentro de la categoría de la vía de la disfunción mitocondrial (Levi y Tiranti, 2019).

A continuación, se presenta una figura con la estructura lineal del gen *C19orf12* con las variantes descritas hasta el momento y se resalta la posición de la variante identificada en el presente estudio (Figura 19).

Figura 19.

Variante en exón 3 del Gen C19orf12 p.Gly65Glu identificada en el grupo familiar estudiado



Nota: Gregory, A., Klopstock, T., Kmiec, T., Hogarth, P., & Hayflick, S. J. (2014). Mitochondrial Membrane Protein-Associated Neurodegeneration. In M. P. Adam (Eds.) et. al., GeneReviews®.

University of Washington, Seattle

En la parentela se identificaron varios miembros que en nuestra opinión se hallan afectados levemente, quienes comparten la misma variante *C19orf12*: c.161G>A p.Gly65Glu encontrada en el caso índice, pero en estado heterocigoto. En los familiares menos afectados fue común encontrar alteraciones comportamentales como impulsividad y síntomas psiquiátricos como labilidad emocional, depresión y ansiedad. Fue llamativo encontrar, adicionalmente, que las dos hermanas del caso índice presentaron dolor de tipo neuropático y una de ellas junto con el padre, presentaron manifestaciones cutáneas del tipo urticariforme; en adición, uno de los primos del caso índice presentó disfemia (trastorno de la fluidez del habla), hallazgos que no se han referido por otros autores en personas heterocigotas quienes presentan una variante patogénica para el gen *C19orf12*: c.161G>A p.Gly65Glu causante de la forma autosómica dominante de NBIA4. En contraste, es de interés la identificación en la misma familia con la variante patogénica en estado heterocigoto para el gen *C19orf12*: c.161G>A p.Gly65Glu, de un tercer fenotipo no penetrante y completamente asintomático del cual hacen parte la madre del caso índice y su sobrina.

La correlación genotipo-fenotipo en la presente familia afectada con NBIA4 propone tres fenotipos: uno clásico con signos y síntomas neurológicos y del comportamiento que se evidenció con la presencia de homocigosidad para una variante patogénica en el gen *C19orf12*; un fenotipo intermedio, principalmente con alteraciones del comportamiento y/o del lenguaje, asociada a la presencia de una copia en estado heterocigoto de la variante patogénica en el gen *C19orf12* y un fenotipo asintomático, no penetrante, en personas sanas pero portadoras de la variante patogénica heterocigota para el gen *C19orf12*. La explicación a esta correlación genotipo-fenotipo variable de acuerdo con el número de alelos mutantes, o bien la penetrancia incompleta observada, escapan de los objetivos del presente estudio, pero puede proponerse que se debe a la presencia de factores modificadores del fenotipo que cambian la severidad de NBIA4. Este hallazgo es la invitación para

que otros grupos que evalúen esta condición genética, interroguen a sus afectados por los síntomas atenuados de la condición o bien evalúen si hay personas asintomáticas portadoras.

Profundizando lo anterior, y con respecto a los hallazgos en la correlación genotipo-fenotipo de los pacientes heterocigotos menos afectados, se plantea la hipótesis de que el factor modificador pudiera ser el resultado de la relación que existe entre el nivel de neurodegeneración por acumulación de hierro con la ferroptosis que conduce progresivamente al daño mitocondrial y estrés oxidativo, con aumento en la producción de radicales libres de oxígeno que alteran la estabilidad celular y activan las vías de señalización intracelular mediadas por factores de crecimiento y las citosinas, provocando daño tisular y celular (Hinarejos et al., 2020 ; Dusek et al., 2022; ., Machuca et al, 2020).

A todos los miembros de la parentela se les ofreció asesoramiento genético, se les entregó un informe escrito que describe las consideraciones anteriores refiriéndose a sus servicios de salud para seguimiento y control por neurología, incluyendo la solicitud de nuevas imágenes de resonancia nuclear magnética cerebral, además de oftalmología y psiquiatría.

En resumen NBIA4 es una condición clínicamente heterogénea en la que, al menos en la presente familia, donde el homocigoto presenta un fenotipo clásico y severo, los heterocigotos se muestran con una afección intermedia consistente en cuadros de ansiedad, labilidad emocional con tendencia a la depresión, así como impulsividad hetero dirigida y, adicionalmente, otros síntomas como dolor de tipo neuropático, manifestaciones cutáneas del tipo urticaria y disfemia, podrían ser parte del espectro de la enfermedad, de acuerdo con el número de alelos de la variante patogénica hallada en el gen *C19orf12* c.161G>A p.Gly65Glu. El estudio, además, documenta el fenómeno de penetrancia incompleta al identificar personas sanas portadoras heterocigotas de la mutación

referida. Sugerimos que estas consideraciones y hallazgos deben ser tenidos en cuenta para otros casos y familias que padecen esta condición. Y que plantean retos para la interpretación clínica de los hallazgos genéticos.

Capítulo III.

Enfermedades Raras Sin Confirmación Diagnóstica

Los avances en la secuenciación de siguiente generación han acelerado el descubrimiento de la causa genética en enfermedades raras. No obstante, no todas las enfermedades tienen una explicación en el análisis genómico y aún existen dificultades para comprender condiciones que no tienen una explicación en la variación genómica o cromosómica. Existen centenares de condiciones poligénicas, multifactoriales o desconocidas que se han estudiado extensivamente y aun así no se puede comprender la etiología y los mecanismos fisiopatogénicos que las originan. Estas condiciones raras se agrupan en una nueva categoría denominada enfermedades raras no diagnosticadas. Una enfermedad rara no diagnosticada es aquella “afección médica de larga duración que elude el diagnóstico de un médico remitente y que se puede considerar como no diagnosticada siendo de interés para un programa de investigación clínica” (Genome, sf)

Estas enfermedades no diagnosticadas hacen parte de programas de investigación avanzada como los que promueven los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en los Estados Unidos de América y son parte de la red de enfermedades no Diagnosticadas (UDN), una iniciativa del fondo común de los NIH que se enfoca en los casos médicos más desconcertantes que son referidos al Centro Clínico de los NIH en Bethesda, Maryland, donde se hallan el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI), la Oficina de Investigaciones de Enfermedades Raras (ORDR) de los NIH y el Centro Clínico de los NIH.

Aunque muchas de las enfermedades raras son monogénicas, la base genética de un número considerable de estas condiciones sigue siendo desconocida. Aún en los casos en los que se conoce el gen causal de la enfermedad, se pueden presentar incertidumbres similares por la presencia de fenotipos variables, heterogéneos e inusuales, incluso en pacientes con la misma mutación causal, lo que plantea desafíos para el diagnóstico. Es por esta razón que los estudios de secuenciación del genoma completo (WGS) o bien la aplicación de estudios funcionales del genoma, pueden aportar más información sobre fenómenos como la penetrancia incompleta, la expresividad variable, la anticipación, la expresión limitada a un género, la presencia de modificadores genéticos y epigenéticos, los efectos de dosis o regulatorios y otras variaciones de la expresión de los genes y de los ácidos nucleicos en estas condiciones raras no diagnosticadas o no bien entendidas (Boycott et al., 2017; Chen et al., 2016; Cordell, 2009) .

En este capítulo se presentará el caso de una mujer joven, quien refiere una sintomatología sugerente de una trimetil aminuria (TMU); que es una enfermedad ofensiva de herencia autosómica recesiva y rara, que se caracteriza en la forma más usual a pesar de su rareza, por la incapacidad de convertir la trimetilamina derivada de la dieta (TMA) en N-óxido de TMA el cual es inodoro, mediante la monooxigenasa 3 que contiene flavina (FMO3) (Kloster y Erichsen, 2021). Las personas afectadas que no pueden completar esta reacción exudan un olor corporal a "pescado" debido a la secreción de TMA en sus fluidos corporales que conducen a una variedad de problemas psicosociales. El síntoma clásico de esta condición es el olor a pescado en las secreciones corporales, que se puede presentar desde la infancia, pero es en la adolescencia cuando aflora este incómodo síntoma.

El diagnóstico se puede realizar a partir de un panel de olor con el paciente, en ayuno y después de repetirlo a las 2 horas luego de la ingesta de alimentos ricos en colina, como son los alimentos que contienen proteínas de origen animal. También se puede hacer el diagnóstico de esta rara condición, determinando la concentración de trimetil aminas en la orina, durante dos tomas diferentes o hacer el diagnóstico a partir de estudios moleculares (Chalmers et al., 2006).

Como la gran mayoría de las enfermedades raras, TMU no tiene un tratamiento específico, pero hay mejora parcial de los síntomas usando productos de limpieza con pH bajo, así como evitando el consumo de alimentos de origen animal (Dolphin et al., 1997).

Presentacion de Caso Clínico

Se trata de una mujer de 29 años de edad, quien refiere que, desde su menarquia, notó que su olor corporal había cambiado, expresando que todas sus secreciones corporales tenían un olor similar al del pescado. El olor se exacerbaba con la ingesta carnes rojas y huevos. Comenta que, por los síntomas referidos, fue valorada por odontología, dermatología y ginecología, sin encontrar el origen ni el alivio de esta condición, que con frecuencia la llevaba al aislamiento social y dificultades en las relaciones interpersonales.

Al indagar sobre sus antecedentes, excepto por el olor de sus secreciones, se define como sana. Niega que otros miembros de su familia presenten esta sintomatología, aunque comenta que no está segura de su origen parental paterno. El desempeño académico ha sido bueno y actualmente es abogada. Comenta que la menarquia fue a los 13 años, es G1P1A0V1 y consume carbón activado con mejoría parcial de los síntomas. Le fueron ordenados algunos exámenes como la medición del ácido vanil mandélico y cortisol, que fueron reportados como normales y niega otros antecedentes personales y familiares.

Figura 20.
Paciente caso síndrome olor a pescado



Estudios Moleculares: Estudio de ADN Mediante Secuenciación de Siguiete Generación, Exoma de Diagnóstico y Panel Comprensivo para Trimenilaminuria y Genes Relacionados

Metodología

Secuenciación de exoma completo y detección de variantes. El DNA genómico fue extraído de la muestra clínica (sangre) de la niña, a partir de la cual se preparó una librería genómica utilizando los protocolos de Illumina con enriquecimiento en las regiones codificantes del genoma (exoma) utilizando hibridación y captura. La secuenciación fue realizada usando un equipo Illumina

NovaSeq 6000. Las lecturas obtenidas fueron mapeadas y comparadas con el genoma de referencia (hg19) y el llamado de variantes fue realizado utilizando la aplicación GATK v4.0.5.1.

Análisis de variantes y generación del reporte. Las variantes obtenidas fueron anotadas y analizadas utilizando el software VarSeq v2.2.1. Procesos de filtrado y análisis permitieron incluir variantes en regiones exónicas y los sitios adyacentes a las regiones de corte y empalme del genoma (*splicing*). Se tomaron en cuenta aquellas variantes con una frecuencia alélica menor del 5%, en grupos poblacionales, según gnomAD v2.1.1. En adición, se estudió de manera específica un panel comprensivo de genes relacionados con la trimetil aminuria, el cual se relaciona a continuación: *CHDH*, *CUTC*, *DMGDH*, *FMO1*, *FMO2*, *FMO4*, *FMO5*, *FMO6P*, *NR1H4*, *OR14C36*, *OR2M7*, *OR5A1*, *PCDHA13* y *TAAR5* (Kloster y Erichsen, 2021)

Toma de Muestras de Laboratorio para Valoración de Función Hepática, Renal y Niveles De Cpk

Metodología:

Se lleva a la paciente a un laboratorio certificado, en donde estando en ayunas, previa asepsia y antisepsia, se procede a la extracción de 2 tubos de sangre tapa roja para el posterior análisis de TGO, TGP, Nitrógeno ureico, creatinina y creatina kinasa total.

Resultados

El resultado del estudio genético se basó en el análisis bioinformático a partir de datos obtenidos por secuenciación del exoma completo (*Whole Exome Sequencing* -WES-). En los datos de secuenciación del panel de genes, se detectó una variante benigna, que se presenta a continuación.

Tabla 12.

Identificación de variante y análisis bioinformático secuenciación de exoma

Gen e identificación de la variante	Tipo	Cigocidad	Fenotipo asociado y herencia	rs/frecuencia poblacional	Patogenicidad
<i>FMO3</i> NM_001002294 .3 c.394G>C NP_001002294. 1: p.Asp132His	Exónica No sinónima	Heterocigota	TMU	rs1207258 2/ 0,0477831	Variante benigna (ClinVar)

Variante FMO3 p.Asp132His NP_001002294.1:

Mutaciones en el gen *FMO3* se han asociado a trimetilaminuria, una entidad autosómica recesiva caracterizada por un olor particular (similar a pescado), producto de un exceso de excreción de trimetilamina en fluidos corporales. La variante c.394G>C (p.Asp132His) ha sido reportada previamente (rs12072582) y es reportada como benigna según ClinVar.

Se reciben reportes de paraclínicos, los cuales se encuentran dentro los rangos de normalidad, se informan en la Tabla 13

Tabla 13.
Reportes de función, renal, hepática y niveles de creatina kinasa total

PARACLÍNICO	RESULTADOS DE LA PACIENTE	VALOR DE REFERENCIA
CREATININA	0.79 mg/dl	0.51 a 0.95 mg/dl
NITROGENO UREICO	12.20 mg/dl	6 a 20 mg/dl
TGO	22 U/L	0 a 32 U/L
TGP	24.90 U/L	0 a 33 U/L
CREATIN KINASA CPK TOTAL	84.20 U/L	26 A 192 U/L

Discusión

La paciente valorada y estudiada en este caso, tiene una clínica sugestiva de la enfermedad rara llamada trimetil aminuria (TMA), dadas las características de mal olor en sus secreciones corporales, clínica que viene presentado desde la adolescencia y, según refiere, se exacerba durante los días del ciclo menstrual, en donde pareciera tener efecto el proceso hormonal durante ese momento. Al no tener claro el origen parental paterno, no es claro si existe o no otro miembro de la familia afectada por esta condición y menciona que, por su relación con el núcleo familiar, es difícil resolver esa inquietud.

Con respecto a los resultados obtenidos, esta paciente tiene una función hepática y renal normales, con lo cual se descartó TMU secundaria. El estudio de secuenciación de exoma analizó de manera específica un panel comprensivo de genes relacionados con la trimetil aminuria, conformado por los genes: *CHDH*, *CUTC*, *DMGDH*, *FMO1*, *FMO2*, *FMO4*, *FMO5*, *FMO6P*, *NR1H4*, *OR14C36*, *OR2M7*, *OR5A1*, *PCDHA13* y *TAAR5*, y reportó la presencia de una variante benigna en el gen más común relacionado con TMU, el gen *FMO3* c.394G>C (p.Asp132His) que ha sido anotada previamente (rs12072582) y es descrita como una variante benigna según ClinVar.

Es llamativo el cuadro clínico de esta paciente que es sugestivo de TMU, pero en quien no fue posible hacer un diagnóstico genético de esta condición, con lo cual para nosotros hace parte del conjunto de enfermedades raras no diagnosticadas a pesar de utilizar una de las mejores herramientas disponibles de diagnóstico genético, como es la secuenciación del exoma completo. Se puede hipotetizar que la causa del síndrome de olor a pescado estaría relacionada con un posible nuevo gen, o bien alteraciones en la expresión de los genes, transcritos, proteínas o factores regulatorios o epigenéticos que pudieran participar en el metabolismo de la trimetilamina. Infortunadamente en nuestro país no hallamos un laboratorio capaz de medir este metabolito u otros intermediarios metabólicos que pudieran estar participando, esto probablemente está atado que la condición es rara, por lo que no se han desarrollado medios de diagnóstico específicos.

En este caso se informaron los hallazgos reportados en los estudios moleculares y en la química sanguínea, se sugirió continuar con la dieta estricta que lleva con lo que refiere mejora parcial de los síntomas.

Conclusiones Generales

- El uso de la medicina genómica permitió corregir el diagnóstico de una enfermedad rara
- Con la medicina genómica se pudo caracterizar a un grupo familiar portador de una variante responsable de una enfermedad neurodegenerativa rara encontrando un fenotipo intermedio no descrito y el diagnóstico temprano en los pacientes sintomáticos más jóvenes permitirá el acceso a manejo interdisciplinario oportuno.
- Los enfoques basados en la genómica aceleran el diagnóstico de las enfermedades raras y reducen la carga socioeconómica.
- La genómica permite resolver y comprender las enfermedades raras
- Las enfermedades raras que se diagnostiquen deben ser confirmadas con estudios moleculares, para no incurrir en diagnósticos y manejos erróneos
- Concientizar y hacer visibles las enfermedades raras, permitirá que los médicos usen la medicina genómica para identificar enfermedades asociadas en función de las características fenotípicas del paciente.

Referencias

- Abtahi, R; Karimzadeh, P; Aryani, O. (2022). Identification of novel mutations among Iranian NPC1 patients: a bioinformatics approach to predict pathogenic mutations. *Hereditas*.
- Abtahi, R., Karimzadeh, P., Aryani, O., Akbarzadeh, D., Salehpour, S., Rezayi, A., . . . Houshmand, M. (2022). Identification of novel mutations among Iranian NPC1 patients: a bioinformatics approach to predict pathogenic mutations. *Hereditas*.
- Angel M, Anta Z, Maldonado CE, Díaz RR, Morales CM. (1944). Definición I. Epónimos en pediatría. ¿Quiénes fueron Albert Niemann y Ludwig Pick ?
- Araque, F., Beltrán, E., y Mozo, A. (2022). Enfermedades huérfanas, el estado colombiano y las instituciones privadas de salud. *Jurídicas Cuc*, 477-496.
- Arends, M., Wanner, C., Hughes, D., Mehta, A., Oder, D., Watkinson, O., . . . Hollak, C. (2016). Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol*, 1631-1641.
- Baker BM, Blackwell PB. (2004). Identification and remediation of pediatric fluency and voice disorders. *J Pediatr Health Care*. Pp 87-94.
- Borgwardt L, Stensland HMFR, Olsen KJ, et al. (2015). Alpha-mannosidosis: Correlation between phenotype, genotype and mutant MAN2B1 subcellular localisation Inherited metabolic diseases. *Orphanet J Rare Dis*.
- Borgwardt, L., Frostad, H., Juul, K., Wibrand, F., Bagterp, H., Beck, M., . . . Meldgaard, A.

- (2015). Alpha-mannosidosis: correlation between phenotype, genotype and mutant MAN2B1 subcellular localisation. *Orphanet J Rare Dis*.
- Boycott, K. M., Rath, A., Chong, J. X., Hartley, T., Alkuraya, F. S., Baynam, G., Brookes, A. J., Brudno, M., Carracedo, A., den Dunnen, J. T., Dyke, S., Estivill, X., Goldblatt, J., Gonthier, C., Groft, S. C., Gut, I., Hamosh, A., Hieter, P., Höhn, S., Hurles, M. E., ... Lochmüller, H. (2017). International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *American journal of human genetics*.
- Brady, R., Kanfer, J., Mock, M., y Fredrickson, D. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 366-369.
- Breiden B, Sandhoff K. (2019). Lysosomal Glycosphingolipid Storage Diseases. *Annu Rev Biochem*.
- Cachon-Gonzalez, MB, Zaccariotto, E. (2018). CTG y T for GGCGT.
- Chen, R., Shi, L., Hakenberg, J., Naughton, B., Sklar, P., Zhang, J., Zhou, H., Tian, L., Prakash, O., Lemire, M., Sleiman, P., Cheng, W. Y., Chen, W., Shah, H., Shen, Y., Fromer, M., Omberg, L., Deardorff, M. A., Zackai, E., Bobe, J. R., Friend, S. H. (2016). Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. *Nature biotechnology*.
- Chalmers, R. A., Bain, M. D., Michelakakis, H., Zschocke, J., y Iles, R. A. (2006). Diagnosis and management of trimethylaminuria (FMO3 deficiency) in children. *Journal of inherited*

metabolic disease, 29(1), 162–172. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0158->

Cordell H. J. (2009). Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nature reviews. Genetics*, 10(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nrg2579>

Crocker, F. (1958). Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore)*, 1-95.

Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA y Phillips Ian R. (1997). Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat Genet* 17: 491–494

Dusek, P., Hofer, T., Alexander, J., Roos, P. M., y Aaseth, J. O. (2022). Cerebral Iron Deposition in Neurodegeneration. *Biomolecules*, 12(5), 714. <https://doi.org/10.3390/biom12050714>

Estres oxidative Hinarejos, I., Machuca-Arellano, C., Sancho, P., y Espinós, C. (2020). Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Neuroinflammation in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA). *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1020. <https://doi.org/10.3390/antiox9101020>

Fernandez, A., y Gouveia , S. (2017). NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research , Diagnosis and Treatment. *Curr Med Chem*, 404-432.

Fernandez-Marmiesse A, Gouveia S. (2017). Couce ML. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research , Diagnosis and Treatment. *Curr Med Chem*.

Finsterer J. (2021). Genotype-Phenotype Correlations in MPAN Due to C19orf12 Variants.

Annals of Indian Academy of Neurology, 24(1), 90–91.

Genome. (sf). Obtenido de <https://www.genome.gov/es/Current-NHGRI-Clinical-Studies/El-Programa-de-Enfermedades-no-Diagnosticadas>

Germain, D. (2010). Fabry disease. Orphanet Journal of Rare Diseases,.

Gregory, A., Lotia, M., Jeong, S. Y., Fox, R., Zhen, D., Sanford, L., Hamada, J., Jahic, A., Beetz, C., Freed, A., Kurian, M. A., Cullup, T., van der Weijden, M., Nguyen, V., Sethavongsack, N., Garcia, D., Krajbich, V., Pham, T., Woltjer, R., George, B. P. Hayflick, S. J. (2019). Autosomal dominant mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration (MPAN). *Molecular genetics & genomic medicine*, 7(7), e00736. <https://doi.org/10.1002/mgg3.736>

Haendel, M., Vasilevsky, N., Unni, D., Harri, N., Harris, N., Rehm, H., . . . Mungal, C. (2020). How many rare diseases are there? *Nature Reviews Drug Discovery* , 77-78.

Hayflick SJ, Kurian MA, Hogarth P. (2018). Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Handb Clin Neurol*. 2018;147:293-305. doi:10.1016/B978-0-444-63233-3.00019-1

Hinarejos, I. et al. (2020). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuroinflammation in neurodegeneration with brain iron accumulation (Nbia). *Antioxidants*. 2020. pp. 1–28.

Hogarth P, Gregory A, Kruer MC, Sanford L, Wagoner W, Natowicz MR, Egel RT, Subramony SH, Goldman JG, Berry-Kravis E, Foulds NC, Hammans SR, Desguerre I, Rodriguez D, Wilson C, Diedrich A, Green S, Tran H, Reese L, Woltjer RL, Hayflick SJ. (2013). New NBIA subtyp and radiographic features of MN.

Huizing, M., Malicdan, C., Gochuico, B., y Gahl, W. (2021). Hermansky-Pudlak Syndrome.

GeneReviews® [Internet].

Huo T, Jia Y, Yin C, Luo X, Zhao J, Wang Z, Lv P. Iron dysregulation in vascular dementia:

Focused on the AMPK/autophagy pathway. *Brain Res* Huo T, Jia Y, Yin C, Luo X, Zhao

J, Wang Z. (2019). LPI dysregulation in vascular dementia: F on the A pathway. *BRB*

ICBF. (2006). Artículo 42 de la Constitución Política. Sentencias C-562 de 1995, C-477 de 1999,

Corte Constitucional.

Im-Aroon T, Wichajarn K, Katanyuwong K, Tanpaiboon P, Vatanavicharn N, Sakpichaisakul K,

Kongkrapan A, Eu-Ahsunthornwattana J, Thongpradit S, Moolsuwan K, Satproedprai N,

Mahasirimongkol S, Lerksuthirat T, Suktitipat B, Jinawath N. (2021). WDI onset S

disease: clinical manifestation and a novel common mutation in T patients.

Instituto Nacional de Salud. (2019). Enfermedades Huérfanas - Raras. Bogotá D.C.

Instituto Nacional de Salud. Enfermedades Huérfanas – Raras. (2019). Colombia Primer

Semestre 2019. Vol 05.

Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, et al. (2019). Predicting Splicing

from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*.

Jaganathan, K., Kyriazopoulou, S., McRae, J., Fazel, S., Knowles, D., Li, Y., . . . Kai-How, K.

(2019). Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*.

Kloster, I., y Erichsen, M. M. (2021). Trimethylaminuria. Trimetylaminuri. *Tidsskrift for den*

- Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke, 141,
10.4045/tidsskr.21.0142. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.21.0142>
- Kolodny, E. (2000). Niemann-Pick disease. *Curr Opin Hematol*, 48-52.
- Kolter T, Sandhoff K. (2009). Lysosomal glycosphingolipid storage diseases.
Neuroglycobiology (Molecular Cell Neurobiol).
- Lemieux, M. J., Mark, B. L., Cherney, M. M., Withers, S. G., Mahuran, D. J., & James, M. N.
(2006). Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of
Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *Journal of molecular
biology*, 359(4), 913–929. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.004>.
- Levi S, Tiranti V. (2019). Neurodegeneration with brain iron accumulation disorders: Valuable
models aimed at understanding the pathogenesis of Iron deposition. *Pharmaceuticals*.
- Lukas J, Scalia S, Eichler S, et al. (2016). Functional and Clinical Consequences of Novel α -
Galactosidase A Mutations in Fabry Disease. *Hum Mutat*. Pp.43-51.
- Lukas, J., Scalia, S., Eichler, S., Pockrandt, A., Dehn, N., Cozma, C., . . . Rolfs, A. (2016).
Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry
Disease. *Hum Mutat*, 43-51.
- Maccarinelli F, Pagani A, Cozzi A, Codazzi F, Di Giacomo G, Capoccia S, Rapino S, Finazzi D,
Politi LS, Cirulli F, Giorgio M, Cremona O, Grohovaz F, Levi S. (2014). A novel
neuroferritinopathy mouse model (FTL 498InsTC) shows progressive brain iron
dysregulation morphological signs of early neurodegeneration and motor coordination

deficits.

Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, et al. (2006). Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Int J Paediatr*

Martina JA, Raben N, Puertollano R. (2021). Snapshot : Lysosomal Storage Diseases.

Martina, J., Raben , N., y Puertollano , R. (2021). Snapshot : Lysosomal Storage Diseases.

Matarazzo Boriani, S. (2016). La adopción en Colombia: un proceso judicial, psicológico y emocional. Reflexión a partir de una experiencia personal. *Revista de Derecho Privado*. 31

Mehta A, Hughes DA. Fabry Disease. (2002). En: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington S.

Meyer E, Kurian MA, Hayflick SJ. (2015). Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: Genetic Diversity and Pathophysiological Mechanisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*.

Ministerio de Salud y Protección. (2010). Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/ley-1392-de-2010.pdf>:6.

Ministerio de Salud y Protección Social. (2018). Obtenido de <http://achc.org.co/wp-content/uploads/2018/12/RESOLUCIÓN-No.-5265-DE-2018-MINSALUD-LISTADO-ENFERMEDADES-HUÉRFANAS>

Newton J, Milstien S, Spiegel S. (2018). Niemann-Pick type C disease: The atypical sphingolipidosis. *Adv Biol Regul*.

- Okada S. (1995). Lysosomal storage disease. *Nippon rinsho Japanese J Clin Med*.
- Patterson, M. (2020). Overview of Niemann-Pick disease. In Dashe, J.F. (Ed.).
- Perretta F, Antongiovanni N, Jauretche S. (2018). Major Organic Involvement in Women with Fabry Disease in Argentina. *Sci World J*.
- Pineda M, Walterfang M, Patterson MC. (2018). Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients: *A review. Orphanet J Rare Dis*
- Platt , F., D’Azzo , A., Davidson , B., y Neufeld , T. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Prim*.
- Radhouane, A. (2017). Rare diseases. *Curr Pediatr Res*, 632-633.
- Rahil, K., y Tarailo-Graovac, M. (2020). Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes*, 11(3), 239. <https://doi.org/10.3390/genes11030239>
- Richter , T., Nestler, S., Babela, R., Khan, Z., Tesoro, T., Molsen , E., y Hughes , D. (2015). Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health*, 906-914.
- Riise Stensland HMF, Klenow HB, Nguyen L Van, Hansen GM, Malm D, Nilssen Ø. (2012). Identification of 83 novel alpha-mannosidosis-associated sequence variants: Functional analysis of MAN2B1 missense mutations. *Hum Mutat*.
- Saudubray JM, Garcia-Cazorla À. (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am*.

Saudubray, J., y Garcia, A. (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am*, 179-208.

Science TWIo. The GeneCards Human Gene Database (Internet) 1996-2014 (updated 23 Oct 2013; cited 2014 11 Febrero). Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPC2&search=NPC2>. No Title.

Sivasubbu , S., & Scaria, V. (2019). Genomics of rare genetic diseases-experiences from India. *Hum Genomics*.

Sung AR, Moretti P, Shaibani A. (2018). Case of late-onset Sandhoff disease due to a novel mutation in the HEXB gene. *Neurol Genet*.

The GeneCards. (2014). Obtenido de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPC2&search=NPC2>. No Title.

Vitales M, Disponibles N, Comisi LA, et al. (2022). Médicos circular número 013 de 2022 circular número XX.

Wang H, Huo X, Han C, Ning J, Chen H, Li B, Liu J, Ma W, Li Q, Yu Y, Shi K. Ferroptosis is involved in the development of neuropathic pain and allodynia. *Mol Cell Biochem*. (2021).

Wang RY, Bodamer OA, Watson MS, Wilcox WR. (2011). Lysosomal storage diseases: Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med*.

Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR. (2007). Heterozygous Fabry women are not just

carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med*.

Wang, R., Bodamer, O., Watson, M., y Wilcox, W. (2011). Lysosomal storage diseases:

Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med*, 457-484.

Wiethoff S, Houlden H. (2017). Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Handb Clin Neurol*.

Wraith JE IJ (2009). N therapies in the management of N-P type C disease: clinical utility of miglustat. T and clinical risk management. 5:877-87. PP 19956552. PCPPE 2009/12/04. eng. No Title.

Wraith, J. (2009). N therapies in the management of N-P type C disease. Clinical Utility of Miglustat T and clinical risk management.

Wraith, J., Vecchio, D., Jacklin, E., Abel, L., Chadna, H., Giorgino, R., y Patterson, M. (2009). Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Molecular Genetics and Metabolism*, 351-357.

Xiao C, Tiff C, Toro C. Sandhoff Disease. (2022 Apr 14). En: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington S 1993–2022. P 35420740. No Title.

Xu, H., y Ren, D. (2015). Lysosomal Physiology. *Rev. Physiol*, 57-80.

Yang, C., y Wang, X. (2021). Lysosome biogenesis : Regulation and functions. 1-15.

Zafra, M., Elipe, C., Rodríguez, R., y Merchán, C. (2018). Epónimos en pediatría. ¿Quiénes fueron Albert Niemann y Ludwig Pick ? Canarias Pediátrica, 214-223.

Anexo Capítulo I

Next-generation sequencing to solve a misdiagnosis in Niemann-Pick type C1 disease in an adoption case.

Authors: Érika Jiménez¹, Oscar Javier Ortega-Recalde¹, Adrién Morel¹, Dora J. Fonseca-Mendoza¹, Daniel Silgado², Carlos Javier Alméciga-Díaz³, Nora Constanza Contreras-Bravo¹, Mauricio Arcos-Burgos⁴ and Carlos M. Restrepo^{1,5}.

1. Centro de Investigación en Genética y Genómica (CIGGUR), Instituto de Medicina Traslacional, Universidad del Rosario, Bogota, Colombia.
2. Genética Molecular de Colombia, Bogota, Colombia.
3. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia.
4. Departamento de Neurociencias. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia.
5. Grupo de Investigación Clínica, Instituto de Medicina Traslacional, Universidad del Rosario, Bogota, Colombia.

Correspondence author: Carlos M. Restrepo. Centro de Investigación en Genética y Genómica (CIGGUR), Universidad del Rosario, Bogota, Colombia.

carlos.restrepo@urosario.edu.co

Keywords: Niemann Pick disease, Sandhoff disease, Fabry disease, adoption, whole exome sequencing, lysosomal diseases, next generation sequencing, enzyme activity, synergistic heterozygosity, genetic counseling.

Abstract: An unusual case of Niemann-Pick type C1 disease in two siblings, one of them under treatment with miglustat, was questioned on the basis of the good neurological performance. Next-generation sequencing (NGS) excluded promotor and coding regions *NPC1* gene mutations but identified that both siblings were heterozygous carriers for a *HEXB* gene mutation, and she was also heterozygous carrier for a *GLA* gene mutation. Hexosaminidase and acid alpha-galactosidase enzyme activity were normal, synergistic heterozygosity was discussed and genetic counseling improved their chance to be adopted.

Introduction

Lysosomal storage diseases (LSDs) are inherited metabolic disorders caused by the deficiency of proteins involved in the lysosomal functioning leading to accumulation of partially degraded substrates within this organelle¹. Protein deficiency leads to cell dysfunction and may affect several peripheral tissues as well as the central nervous system, depending on the storage substrate. The natural history of LSDs, finishes with the development of neurodegenerative disorders with significant impact in the patient's health and quality of life, leading, in most cases, to early death². These disorders may be classified according to storage substrates, such as lipidosis (including sphingolipidosis), mucopolysaccharidosis, and glycoproteinosis³.

Sphingolipidosis are LSDs produced by a defective degradation and accumulation of sphingolipids. This group of disorders includes Fabry (FD), Gaucher (GD), and Niemann Pick

(NPC) diseases, as well as the GM2 gangliosidosis (Sandhoff disease (SD)), Tay-Sachs disease, and AB hexosaminidase variant⁴. NPC outlines four types in which sphingomyelin and cholesterol accumulate in the brain, peripheral nerves, liver, and spleen.

Niemann-Pick disease (NP) is a rare lysosomal storage disease with five types: A, B, C1, C2 and D. NP type C1 (NPC1) is caused by homozygous or composed heterozygous *NPC1* gene mutations transmitted by autosomal recessive inheritance (Richter et al., 2015) that accounts for 95% of cases and is a rare disease with an incidence of 1 in 120,000 to 150,000 births (Sivasubbu y Scaria, 2019).

We used next generation sequencing (NGS) in two siblings to address possible *NPC1* gene mutations, one of them under treatment with miglustat. Both children were healthy, any of them have *NPC1* mutation, both were heterozygous carriers for *HEXB* gene mutation, and she was heterozygous carrier for *GLA* gene mutation. This article is an example of lysosomal disease misdiagnosis and two secondary findings, possible synergistic heterozygosity was discussed and genetic counseling improve, after NGS analysis, their chance for adoption.

Materials and methods.

Patients

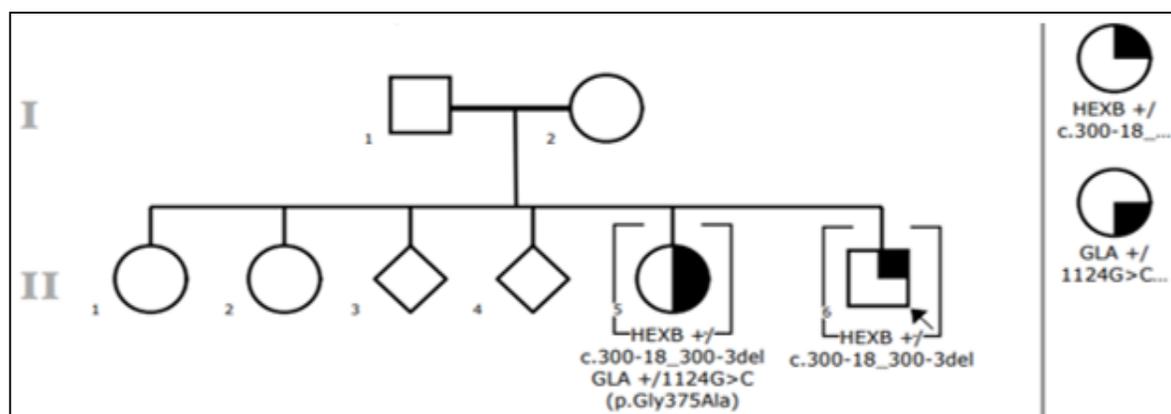
Case 1. Index case is a 9-month-old boy, referred to rule out neurological deficit, who has a sibling with NPC1 disease. He was the sixth uncontrolled pregnancy from a 31-year-old healthy mother and an unknown father. Parents were non consanguineous, and both were substance use abusers. The route of delivery was unknown. Birth weight and length were 3.640 gr. (P50) and 46 cm (P3), respectively. Psychomotor development was normal (cervical control at 1 month, reaches

dangling objects and rolls back from tummy at 3 months, sitting without support at 8 months). The sibship was composed by two healthy female siblings given up for adoption, two other children had unknown destiny and health conditions, and a 7-year-old sister had a diagnosis of NPC1 (**Figure 1**). Physical examination was normal: height 72 cm (P50), wingspan of 69.5 cm and HC 45 cm (P50). At 9 months, the neuropsychiatric evaluation was reported as normal.

Case 2. A 9-year-old girl, and sister of case 1, was referred with the diagnosis of NPC1, and she was under treatment with miglustat (Zavesca) for 3 years. Mother's pregnancy, delivery and neurodevelopment records were unavailable. She had a positive Filipin test⁷ (data not shown). She attended the fourth grade of primary school with good school performance. She has a mild height growth delay (121.5 cm, P25; SD:0) and no weight gain (20.3 kg, P3), and occasionally complained of headache, nausea, dizziness and lower limbs myalgia. Physical and neurological examinations were normal, without gait disturbances or hypotonia (**Figure 1**).

Figure 1.

Pedigree case 1 and case 2



Laboratory tests.

In both cases, an informed consent, to warrant access to clinical records and biological samples to perform genetic tests and enzymatic assays, was obtained from the family advocate (According with the ethics criteria required by the “Instituto Colombiano de Bienestar Familiar” that represents the Colombian’s government office taking care of orphan children). The study accomplished with the recommendations of the Declaration of Helsinki (Ministerio de Salud y Protección , 2010).

Genomic DNA was extracted from the venous blood puncture with EDTA anticoagulant. A genomic library was prepared using the Illumina protocols, with enrichment of the genome coding regions (exome) using hybridization and capture.

Next generation genomic sequencing (NGS) was carried out using Illumina NovaSeq 6000 equipment. The readings obtained were mapped and compared with those of the reference genome (hg19), and the call for variants was carried out using GATK v4.0.5.1.

The variants obtained were annotated and analyzed using the VarSeq v2.2.1 software through filtering and analysis processes that allowed the inclusion of variants in exonic regions and in sites adjacent to the splicing regions of the genome. The frequency of variants with a minimum allele frequency (MAF) less than 1% was taken into account, according to gnomAD v2.1.1. The variants identified as pathogenic were verified by Sanger sequencing.

Bioinformatics analyses were performed together with the analysis of a comprehensive multigenic panel for the following genes related to lysosomal diseases: *AP3B1*, *ARSA*, *ARSB*, *ASAHI*, *BLOC1S3*, *CLN10*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN7*, *CLN8*, *CTNS*, *CTSA*, *CTSK*, *DTNBP1*, *FUCA1*, *GAA*, *GALC*, *GALNS*, *GBA*, *GLA*, *GLB1*, *GM2A*, *GNPTAB*, *GNPTG*, *GNS*, *GUSB*,

HEXA, HEXB, HGSNAT, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HYAL1, IDS, IDUA, LAMP2, LAMP3, LIPA, MAN2B1, MANBA, MCOLN1, NAGA, NAGLU, NEU1, NPC1, NPC2, PPT1, PSAP, SGSH, SLC17A5, SMPD1, SUMF1 and TPP1 (Instituto Nacional de Salud, 2019).

Total hexosaminidases (Hex A and B) and α -galactosidase activities were evaluated through fluorometry assays (Araque et al., 2022). For this purpose, leukocytes were separated from 10 mL of heparinized peripheral blood. The leukocyte pellet then lysated by sonication and the protein determination carried out by the Folin-Lowry method. Finally, the catalytic activity of the enzyme was determined by 4-methylumbelliferyl- β -D-acetyl-glucosaminide (MUG, Sigma-Aldrich) and 4-methylumbelliferyl- α -D-galactopyroniside (Santa Cruz Biotechnology) for total hexosaminidases and α -galactosidase, respectively (Instituto Nacional de Salud, 2019). Enzyme activity is expressed as the amount of enzyme hydrolyzing 1 nmol of substrate per hour.

Results.

Case 1. WES analysis showed no pathogenic or likely-pathogenic variants for the *NPCI* gene. A *HEXB* heterozygous gene deletion c.300-18_300-2del (ENST00000261416.12) was identified. This finding was not reported in Ensembl, RefSeq, gnomAD, ExAc and ClinVar databases, so it was classified as a variant with unknown significance (**Figure 1A**).

Case 2. WES and lysosomal multigenic panel analysis showed no pathogenic or likely-pathogenic variants for the *NPCI* gene. Bioinformatic analysis showed five variants (Table 1), one of them was on *HEXB*: c.300-18_300-3del (ENST00000261416.12) (**Figure 1A**), and the other was identified in *GLA*: p.Gly375Ala rs869312164 (**Table 1**) genes.

Figure 1A.

Electroforetogram case 1 and case 2

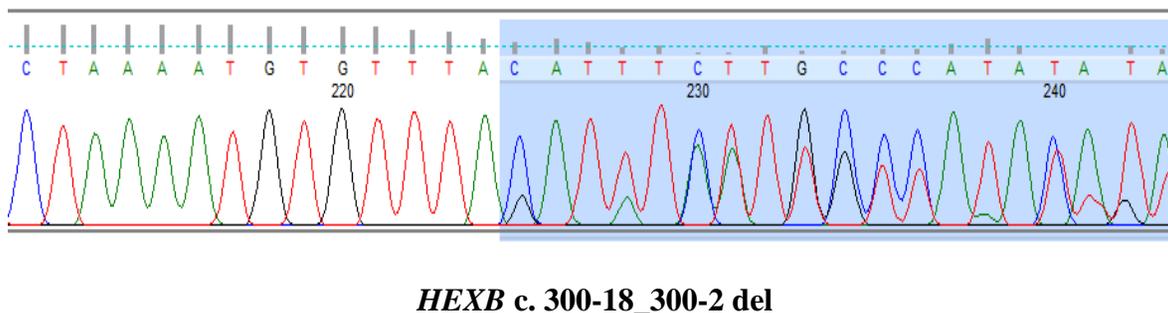


Table 1.
Variants identified in the exome

Gene and variant identification	Type	Cigocity	Associated phenotype and inheritance	rs/population frequency	Pathogenicity
AP3B1 NM_003664.4: c.2995G>A NP_003655.3:p.Val999Met	Exonic not synonymus	Heterozygous	Hermansky- Pudlak Syndrome 2 (RA)	rs146503597/ 0.00413124	Variant of uncertain meaning (VUS) (Clinvar) Benign in a report
GLA NM_000169.2: c.1124G>C NP_000160.1: p.Gly375Ala	Exonic not synonymus	Heterozygous	Fabry disease (XL)	rs869312164/ Not available	Probably pathogenic (Clinvar)
HEXB NM_000521.3: c.300-18_300-2del	Intronic splicing site	Heterozygous	Sandhoff disease (RA)	Not available/ Not available	Probably pathogenic (computacional prediction)
HP55 NM_181507.1: c.2537C>T NP_852608.1:p.Pro846Leu	Exonic not synonymus	Heterozygous	Hermansky- Pudlak Syndrome (RA)	rs144875223/ 0.00477843	Benign (Clinvar)
MAN2B1 NM_000528.3: c.844C>T NP_000519.2: p.Pro282Ser	Exonic not synonymus	Heterozygous	Alpha manosidosis (AR)	rs45576136/ 0.00259669	VUS (Clinvar) Benign in a report

Enzyme activity of hexosaminidase A and B, and α -galactosidase, are shown in Table 2

Table 2
Enzymatic activity

Enzyme	Patient value	Control value
Total hexosaminidase	303.7 nmol/h/mg	369.20 nmol/h/mg
Hexosaminidase A	71.8 %	57.9%
Hexosaminidase B	57.1 nmol/h/mg	155.30 nmol/h/mg
Alpha galactosidase	15.45 nmol/h/mg	24.21 nmol/h/mg

Discussion.

NPC1 gene maps on chromosome 18q11.2 and codes for a low-density lipoprotein involved in transport to endosomal/lisosomal compartments where it is hydrolyzed and released as cholesterol-free lipids. Niemann-Pick type C1 disease (NPC1) is caused by mutations in this gene. NPC1 clinical features are associated to severe neuronal degeneration, cognitive impairment, behavioral disorders, seizures, abnormal eye movements, dysphagia, dysarthria, dystonia, hepatomegaly, and ataxia (Sivasubbu y Scaria, 2019). Clinical evaluation of the two siblings do not show or support any neurological and behavioral findings. Noteworthy, Case 2 patient did not present any NPC1 common signs and symptoms; instead, she showed good school and social performance. For this patient, previous NPC1 diagnosis and miglustat treatment was only supported with a positive Filipin test. The active substance in Zavesca is miglustat, which reduces the production of glycosphingolipids in cells by inhibiting the function of glucosylceramide synthase enzyme. This medicine has received marketing authorization in Europe and other countries for the specific treatment of neurological manifestations of type 1 Gaucher disease and type C Niemann-Pick disease (Martina et al., 2021). Filipin test is considered a gold standard for the diagnosis of NPC patients (it represents an increase of lysosomal unesterified LDL cholesterol molecules or cytoplasmic decrease of esterified LDL cholesterol in fibroblast skin cultured cells). Although, the Filipin test is an efficient (sensitivity and specificity), tool for the diagnosis of NPC patients, it is highly dependent on the technical conditions. Indeed, it has been reported that in about 15% of the cases, the Filipin test is inconclusive and may need additional confirmation by other diagnostic techniques such as NPC1 enzyme activity measurement and *NPC1* gene sequencing.

In our cases, WES and lysosomal multigene gene panel analysis do not show or identify any mutation on the *NPC1* gene. Most of the variants published in *NPC1* gene are missense, nonsense or small deletion mutations, with the present WES analysis, we do not find other variations on the promotor or intronic regions (Yang y Wang, 2021), ruling out NPC1 diagnosis. Consequently, after genetic counseling session, miglustat treatment was suspended and she was eligible for adoption.

HEXB gene homozygous or compound heterozygous mutations are related with Sandhoff disease (SD). *HEXB* gene is located on chromosome 5q13.3 and code hexosaminidase B (beta subunit of the lysosomal enzyme beta-hexosaminidase), hexosaminidase B together with the cofactor GM2 activator protein catalyzes ganglioside GM2 degradation. *HEXB* mutations lead to an accumulation of GM2 ganglioside in neurons and causes a neurodegenerative disorder termed GM2 gangliosidosis. SD patients show progressive neurodegeneration from 2-9 months, with progressive weakness, cognitive deficit, visual impairment and hearing loss, seizures, and death in most cases before age 3 (Xu y Ren, 2015). SD has a less frequent, late-onset variation that includes a broad spectrum of neurological disorders such as spinocerebellar ataxia, motor neuron disease and sensory neuropathy, tremor, dystonia, and psychosis that is associated with compound heterozygous mutations (Xu y Ren, 2015). None of the two clinical pictures of SD was present in the children. The variant identified and reported as an incidental finding, in a heterozygous state is new, it is found in an splicing acceptor site by *in silico* analysis with the SpliceAI software (Platt et al. , 2018). It reported a score of 0.94 (high precision > 0.8), for the loss of the splicing acceptor site, suggesting that this DNA variant is probably pathogenic. However, both siblings have heterozygous carrier status for *HEXB* c.300-18_300-2.

GLA gene maps on chromosome Xq22.1 and encodes a glycoprotein called α -galactosidase (GLA) engaged in alpha-galactosyl moieties hydrolysis from glycolipids and glycoproteins. GLA hydrolyzes ceramide trihexoside which catalyze the hydrolysis of melibiose into galactose and glucose. Mutations in *GLA* gene causes Fabry disease (FD).

FD is a recessive X-linked lysosomal condition caused by the deficiency of the α -galactosidase enzyme. Males are classically affected and, occasionally, women are mildly symptomatic. Globotriaosylceramide is a glycosphingolipid present throughout the body but accumulates in FD, mainly inside the cells of blood vessels, nervous system, heart, kidneys, and skin (Platt et al. , 2018). Symptoms in affected males, appear during childhood or adolescence and include transient ischemic attacks, cerebrovascular disease, dementia, periodic attacks of severe pain in the extremities (acroparesthesias), skin vascular lesions (angiokeratomas), cardiomyopathy, arrhythmia, valvular stenosis of the heart, chronic kidney disease and heat intolerance due to hypohidrosis. FD symptomatic women have abnormalities of the nervous system, kidney disease, and chronic pain, at increased risk for cerebrovascular disease, high blood pressure, heart disease, and kidney damage¹³. In Case 2 was identified a heterozygous known incidental finding annotated as *GLA* c.1124G>C (p.Gly375Ala), (rs869312164), which is pathogenic according to ClinVar. *In vitro* test of this 1 variant has shown a residual enzyme activity of 44.1% \pm 10.1 (Saudubray y Garcia, 2018).

HEXB and GLA heterozygous mutations were incidental findings in both siblings extends the question about their enzymatic hexosaminidase and α -galactosidase activity. Case 1 was given in adoptionadoption previously to be tested, and he was not available for further analysis. Case 2, who was diagnosed as an NPC1, and has been receiving miglustat regularly for

three years stayed in a lower adoptability status because miglustat is a high-cost therapy.

Miglustat was designated an orphan drug, so it can only be ordered by a skilled physician and it is a high-cost precision medicine, according to Colombian National Commission Medicines and Medical Devices, for 2022, monthly miglustat treatment price was USD 4.655(Zafra et al., 2018). Hexosaminidase (A, B and total) and α -galactosidase enzymatic activities were both mildly diminished; specifically, HexB activity showed a 63% reduction, which can be explained by a heterozygous variant finding, she had a 37% residual activity, which was consistent with a normal life. It has been widely reported that levels greater than 10% of an enzyme are enough to have an attenuated or normal phenotype. As result, her health status was considered normal and miglustat was stopped, NPC1 diagnosis was ruled out, and her adoption handicap improved, in fact, she was adopted three months late¹⁶

Metabolic diseases show considerable clinical variation in the severity of symptoms that can be attributed to differential effects of specific mutations on the function of genes/enzymes that make the genotype/phenotype correlation inaccurate, be it due to modifying factors, epigenetic or because they concur in their action in more than one pathway or in multiple steps of a metabolic pathway.

This study shows how a NGS analysis quickly helped to solve a lysosomal disease misdiagnosis in a sibling couple, one of them which had been diagnosed with NPC1. The younger healthy brother was affected in his adoption process due to his sister NPC1 diagnosis and the high-cost miglustat treatment; both were ineligible for adoption. NGS analysis refuses NPC1 diagnosis and NGS incidental findings for two lysosomal diseases were clarified with classical enzyme activity analysis. Molecular DNA analysis, enzyme activity, and genetic

counseling restore for these children a positive adoptability status. We suggest confirmatory DNA analysis for all patients under suspect for NPC1 disease.

All these findings in this complex and interesting case were discussed with the children's institutional care advocates. In addition, they were assessed that the siblings reach adulthood they must be informed about their genetic status as heterozygous *HEXB* and *GLA* mutation carriers, information that is not usual to share with children who participate in adoption processes (Brady et al., 1966).

Anexo Caso 2

Valoración por neurólogo especialista en trastornos del movimiento, a la paciente del caso índice, se anexa historia clínica.