



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de
fin de grao

Cribado genético neonatal: aspectos técnicos, éticos y psicosociales

Cribado xenético neonatal: aspectos técnicos, éticos e psicosociais

Newborn genetic screening: technical, ethical and psychosocial aspects

Autora: Ángela López Pena

Titora: María de la Luz Couce Pico

Cotitora: María José de Castro López

Departamento: Ciencias Forenses,
Anatomía Patolóxica, Ginecología y
Obstetricia y Pediatría

JUNIO 2023

Traballo de Fin de Grao presentado na Facultade de Medicina e Odontoloxía da Universidade de Santiago de Compostela para a obtención do Grao en Medicina

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
1.1 Retos diagnósticos en las enfermedades genéticas.....	9
1.2 Pruebas genéticas diagnósticas empleadas en Pediatría.....	10
1.2.1 Diagnóstico genético convencional.....	10
1.2.2 Diagnóstico genómico: Era de la secuenciación masiva.....	11
1.2.2.1 WES.....	12
1.2.2.2 WGS.....	13
1.2.2.3 Enfoque en tríos.....	13
1.3 Concepto de NBS.....	13
1.3.1. NBS actual: metabólico.....	14
1.3.2. NBS genómico: NGS.....	18
1.4 Consideraciones éticas.....	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	22
4.1 Características de los estudios.....	22
Tabla 3. Tabla resumen de los estudios que emplearon WES como método de secuenciación.....	26
Tabla 4. Tabla resumen del estudio que empleó WGS como método de secuenciación.....	28
Tabla 5. Tabla resumen de los estudios que emplearon un Panel de genes como método de secuenciación.....	29
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

ABREVIATURAS

AEGH: Asociación Española de Genética Humana
AEPEd: Asociación Española de Pediatría
BCH: Boston Children´s Hospital
BWH: Brigham and Woman´s Hospital
CES: secuenciación del exoma clínico
CMA: microarray cromosómico
CNV: variación en el número de copias
DBS: gotas de sangre seca
EMH: Enfermedades Metabólicas Hereditarias
FISH: hibridación in situ mediante inmunofluorescencia
HC: hipotiroidismo congénito
IBA: Análisis basado en indicaciones
MGH: Massachusetts General Hospital
MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MS/MS: Espectrometría de masas “en tándem”
MSUD: enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce
MTA-Seq: secuenciación de amplicones por PCR multiplex
NBS: Newborn Screening
NCHS: Centro Nacional de Estadísticas de Salud
NC NEXUS: North Carolina Newborn Exome Sequencing for Universal Screening
NGS: Secuenciación de Nueva Generación
NGSR: informe de secuenciación genómica de recién nacidos
NHS: National Health Service
NSIGHT: Newborn Sequencing in Genomic and Public Health
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
P/LP: variantes patogénicas/ probablemente patogénicas
PGx: farmacogenómica
PKU: fenilcetonuria
PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
RCT: ensayo clínico controlado y aleatorizado
RUSP: Panel Uniforme Recomendado de detección
SNVs: variantes de nucleótidos individuales
TAT: tiempo de respuesta
VA: Commonwealth of Virginia
VUS: variante de significado incierto
WES: secuenciación del exoma completo
WGS: secuenciación del genoma completo

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades genéticas constituyen una parte notable de la patología pediátrica. El cribado neonatal es un programa de salud pública cuyo objetivo es identificar a los recién nacidos presintomáticos con trastornos en los que un tratamiento precoz evitaría el desarrollo de daños graves e irreversibles. El rápido avance de las técnicas de secuenciación masiva ha supuesto una revolución a nivel médico, planteándose su implementación en el cribado metabólico actual. Sin embargo, la decisión de adoptar un programa de este tipo debe abordar previamente el análisis de varias consideraciones.

Objetivos: Obtener la evidencia disponible hasta la fecha acerca de los aspectos técnicos, éticos y sociales de la implementación del cribado genético neonatal como prueba de primer nivel.

Material y métodos: Esta revisión resume la evidencia disponible sobre el empleo de diferentes métodos de NGS en un entorno de cribado neonatal. Para ello, se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos siguiendo la declaración PRISMA, estableciéndose previamente criterios de inclusión y exclusión utilizando el sistema PICO.

Resultados: Finalmente fueron incluidos 7 estudios, que emplearon WES, WGS o paneles genéticos como método de secuenciación. En general, demostraron una reducción de la sensibilidad respecto al cribado neonatal convencional, así como la identificación de una gran cantidad de hallazgos secundarios.

Discusión: La cantidad de información generada mostró hallazgos incidentales y variantes relacionadas con el estado de portador, que suponen un desafío en cuanto a su interpretación y divulgación al no demostrar utilidad clínica inmediata; pudiendo suscitar estrés familiar y una sobrecarga en el circuito asistencial, requiriendo además el desarrollo de protocolos de seguimiento adecuados en el caso de la identificación de variantes de significado incierto.

Conclusiones: La NGS no debería reemplazar al cribado metabólico actual, pudiendo resultar de utilidad como método complementario; y es necesario el desarrollo de estudios futuros para investigar más en detalle los factores técnicos, éticos y psicosociales asociados al cribado genético.

Palabras clave: cribado neonatal; recién nacido; secuenciación de nueva generación; exoma; genoma; paneles genéticos; aspectos técnicos, éticos y psicosociales.

RESUMO

Introdución: As enfermidades xenéticas constitúen unha parte notable da patoloxía pediátrica. O cribado neonatal é un programa de saúde pública cuxo obxectivo é identificar aos neonatos sans presintomáticos con trastornos nos que un tratamento precoz evitaría o desenvolvemento de danos graves e irreversibles. O rápido avance das técnicas de secuenciación masiva supuxo unha revolución a nivel médico, plantexándose a súa implementación no cribado metabólico actual. Sen embargo, a decisión de adoptar un programa deste tipo debe abordar previamente a análise de varias consideracións.

Obxectivos: Obter a evidencia dispoñible ata a data acerca dos aspectos técnicos, éticos e sociais da implementación do cribado xenético neonatal como proba de primeiro nivel.

Material e métodos: Esta revisión resume a evidencia dispoñible sobre o emprego de diferentes métodos de secuenciación nun entorno de cribado neonatal. Para iso, realizouse unha búsqueda nas diferentes bases de datos seguindo a declaración PRISMA, establecéndose previamente criterios de inclusión e exclusión utilizando o sistema PICO.

Resultados: Finalmente foron incluídos 7 estudos, que empregaron WES, WGS ou paneis xenéticos como métodos de secuenciación. En xeral, demostrouse unha redución da sensibilidade con respecto ao cribado neonatal convencional, así como a identificación dunha gran cantidade de achados secundarios.

Discusión: A cantidade de información xerada mostrou achados incidentais e variantes relacionadas co estado de portador, que amosan un desafío en canto a súa interpretación e divulgación ao non amosar utilidade clínica inmediata; podendo suscitar estrés familiar e unha sobrecarga no circuito asistencial, esixindo ademais o desenvolvemento de protocolos de seguimento adecuados no caso de identificación de variantes de significado incerto.

Conclusións: A NGS non debería reemplazar ao cribado metabólico actual, aínda que pode ser útil como método complementario; e é necesario o desenvolvemento de estudos futuros para investigar máis en profundidade os factores técnicos, éticos e psicosociais asociados ao cribado xenético.

Palabras chave: cribado neonatal; neonatos; secuenciación de nova xeración; exoma; xenoma; paneis xenéticos; aspectos técnicos, éticos e psicosociais.

ABSTRACT

Introduction: Genetic diseases constitute an important part of pediatric pathology. Neonatal screening is a public health program whose objective is to identify presymptomatic newborns with disorders in which early treatment would prevent the development of serious and irreversible damage. The rapid advance of massive sequencing techniques has meant a revolution at the medical level, considering its implementation in current metabolic screening. However, the decision to adopt a program of this type must first address the analysis of several considerations.

Aims: Obtain the evidence available to date about the technical, ethical, and social aspects of the implementation of neonatal genetic screening as a first level test.

Material and methods: This review summarizes the available evidence on the use of different NGS methods in a newborn screening setting. For this, a search was carried out in different databases following the PRISMA statement, establishing inclusion and exclusion criteria using the PICO system.

Results: Finally, 7 studies were included, which used WES, WGS or genetic panels as sequencing methods. In general, a decrease in sensitivity compared to conventional neonatal screening was demonstrated, as well as the identification of many secondary findings.

Discussion: The amount of information generated showed incidental findings and variants related to the carrier state, which involve a challenge in terms of their interpretation and dissemination as they do not demonstrate immediate clinical utility; may cause family stress and an overload in the care circuit, also requiring the development of adequate follow-up protocols in the case of identification of uncertain significance variants.

Conclusions: The NGS should not replace the current metabolic newborn screening, although it may be useful as a complementary method; and the development of future studies is necessary to further investigate the technical, ethical, and psychosocial factors associated with genetic screening.

Key words: neonatal screening; newborn; next generation sequencing; exome; genome; genetic panels; technical, ethical, and psychosocial aspects.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades genéticas (la mayoría de las cuales son raras) son condiciones causadas por cambios en el ADN que pueden afectar a cualquier sistema del organismo. La base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) incluye aproximadamente 70000 enfermedades, afectando la mayoría a la edad pediátrica (1). Estas patologías incluyen alteraciones cromosómicas o a trastornos mendelianos, como los errores congénitos del metabolismo; y pueden presentarse al nacimiento, en el período neonatal o durante la primera infancia, teniendo normalmente un gran impacto en los afectados.

A lo largo del tiempo, se han llevado a cabo varios estudios para evaluar la huella de la genética dentro de la patología pediátrica; obteniéndose como resultado global que el porcentaje de pacientes con una enfermedad de etiología genética se puede dividir según dos situaciones clínicas: por un lado, en un hospital general se encuentra en aproximadamente un 5% de los individuos; por otro lado, se eleva a un 70% en los niños ingresados en las unidades de cuidados intensivos neonatales (2).

1.1 RETOS DIAGNÓSTICOS EN LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

Los datos recogidos en el CIE-10 a partir de certificados de defunción, generados en base a datos del Centro Nacional de Estadísticas de Salud (NCHS), sugieren que la causa de mortalidad infantil más frecuente-estimándose en una cuarta parte de las muertes pediátricas-se encuentra en la categoría de “malformaciones congénitas, deformaciones y anomalías cromosómicas” (Q00-Q99) (3). Además, pese a que alrededor de un 50% de los recién nacidos que ingresan en una UCI neonatal lo hacen con una sospecha de enfermedad genética solamente se confirma este diagnóstico en un 20-30% de los casos, mayoritariamente post-mortem (4).

Si bien es cierto que existe una gran variedad de enfermedades genéticas que pueden sospecharse gracias a los hallazgos de la exploración física y la anamnesis, es necesaria la confirmación genética para ponerle nombre propio a la enfermedad y establecer un diagnóstico definitivo. Además, existen diversos factores, entre los que destacan la heterogeneidad clínica y genética o la comorbilidad asociada a los neonatos, que dificultan enormemente el diagnóstico genético en los recién nacidos. Es por esto por lo que los pacientes ingresados en la UCIN podrían beneficiarse enormemente de diagnóstico genético rápido, mejorando el manejo clínico y la orientación hacia terapias dirigidas curativas, o bien hacia cuidados paliativos y de confort, muy importantes en estos casos ya que evitan la iatrogenia y los tratamientos fútiles.

1.2 TIPOS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO EMPLEADAS (Figura 1)

Los trastornos genéticos, aunque considerados infrecuentes en la población general, constituyen una parte notable de la patología pediátrica, como ya se ha comentado anteriormente. Resultan de gran importancia la anamnesis completa y la exploración física minuciosa, que no debieran ser sustituidos en ningún caso; así como la elección correcta de la prueba empleada para llegar al diagnóstico final, con el fin de evitar la incertidumbre familiar.

1.2.1 DIAGNÓSTICO GENÉTICO CONVENCIONAL

Desde el inicio de la genética clínica se han empleado múltiples técnicas citogenéticas con el fin de analizar cromosomas completos o fragmentos de ADN. Dentro del diagnóstico genético convencional, en busca de anomalías en la estructura del genoma, destacan tres pruebas principales: cariotipo, FISH y MLPA.

- El cariotipo de bandas G es una prueba citogenética de baja resolución que tiene como objetivo principal la identificación de anomalías numéricas y, en menor medida, estructurales de los cromosomas siendo una de sus aplicaciones más destacables el diagnóstico prenatal de alteraciones cromosómicas causantes de variables patologías de origen genética, como el Síndrome de Down.
- La hibridación in situ mediante inmunofluorescencia (FISH) emergió a principios de la década de los 90, estando disponible para un número limitado de patologías. Es un método empleado para localizar un fragmento de ADN en el genoma. Presenta un mayor rendimiento que el cariotipo de bandas G al ser capaz de identificar anomalías submicroscópicas implicadas en la enfermedad.
- La MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) destaca dentro de las técnicas más selectas de biología molecular en la búsqueda de microdeleciones, entre otras.

El cariotipo de bandas G y la FISH han sido sustituidos, en las últimas décadas, por el microarray cromosómico (CMA) que permite analizar el genoma completo de un individuo simultáneamente permitiendo evaluar los desequilibrios en el número de copias de los cromosomas, principalmente; aumentando considerablemente la resolución respecto al cariotipo de bandas G. No obstante, y a pesar de ser el CMA una prueba de gran peso, solo permite detectar fallos en la información genómica, siendo útil únicamente en aquellas anomalías que impliquen una pérdida o ganancia cromosómica total y no en aquellas que incluyan simplemente, por ejemplo, un reordenamiento (5).

También dentro del diagnóstico convencional, pero buscando anomalías en la secuencia del genoma, destaca la secuenciación de Sanger que ha sido y es la prueba angular en la búsqueda de mutaciones puntuales en el diagnóstico de una patología

monogénica concreta. Fue desarrollada en 1977 por Frederick Sanger y permite detectar variantes de nucleótido individuales (SNVs), pequeñas deleciones o inserciones, mediante la secuenciación de tramos cortos de ADN. Se basa en pruebas de análisis de un solo gen, examinando en primera instancia el que más frecuentemente se asocia con el fenotipo del paciente y, si resultase negativo, avanzando hacia otros posibles genes causantes. Su mayor desventaja es, además del elevado coste, los largos tiempos de respuesta (2).

1.2.2 DIAGNÓSTICO GENÓMICO: ERA DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA

Años después de la finalización del Proyecto Genoma Humano (1990-2003), emergió la llamada secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). Existen diversas plataformas que permiten realizar una gran cantidad de análisis de forma paralela, reduciendo costos y aumentando el rendimiento diagnóstico respecto a la secuenciación de Sanger, su precursora.

Actualmente, se encuentran disponibles diferentes tipos de NGS. Por un lado, existen enfoques dirigidos hacia una patología concreta, que incluyen (6):

- la secuenciación de genes individuales y los paneles de genes asociados a un fenotipo específico
- el exoma clínico (CES), que implica el análisis de todos los exones de los genes que se conocen en la actualidad como causa de patologías.

Por otro lado, dentro de las pruebas no dirigidas se encuentran (7):

- la secuenciación del exoma completo (WES), que abarca la secuenciación de todos los exones de los genes codificantes de proteínas
- la secuenciación del genoma completo (WGS).

El panel de genes resulta clínicamente atractivo debido a que reduce la cantidad de hallazgos no relacionados y hallazgos incidentales, aunque su uso puede llevar a errores diagnósticos debido a falsos negativos. Por este motivo, puede resultar útil realizar un enfoque combinado. En primer lugar, un enfoque dirigido, como un panel de genes que aumente la especificidad de la prueba; y añadir una prueba no dirigida, WES o WGS, capaz de disminuir los falsos negativos generados por la prueba dirigida y de identificar cualquier anomalía genética que no esté cubierta por el panel.

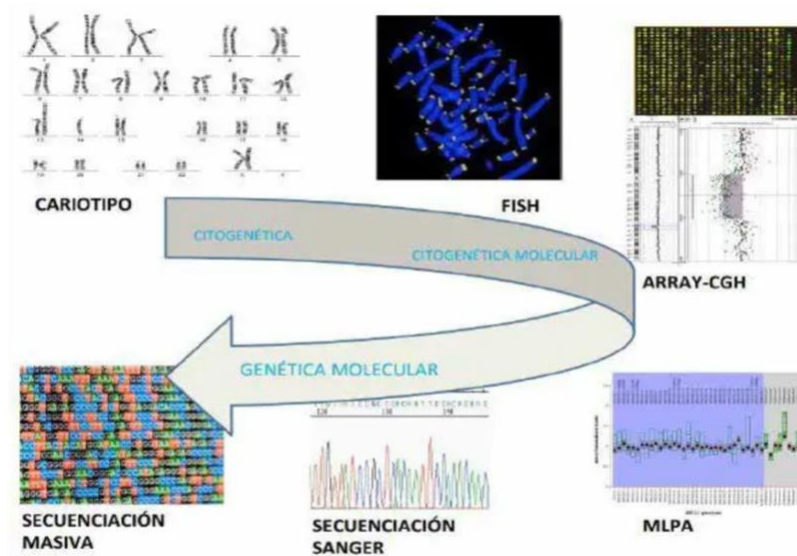


Figura 1. Principales pruebas genéticas diagnósticas (8). Disponible en: <https://scptfe.com/wp-content/uploads/2022/07/46-2-Genetica-en-pediatria.pdf>

1.2.2.1 WES

La secuenciación del exoma completo (WES) abarca exclusivamente las regiones codificantes del ADN, que corresponden aproximadamente al 1-2% total del genoma humano (5). No obstante, aloja el 85% de las variaciones que causan enfermedades. Esta técnica se empleó por primera vez en 2009 demostrando desde entonces un elevado, aunque variable, rendimiento diagnóstico. Además, se ha visto que este rendimiento puede verse aumentado al realizar un enfoque en tríos en el cual se analizan las muestras del niño y las de ambos padres biológicos, permitiendo cribar variantes raras benignas, variantes de *novo* presentes exclusivamente en el niño y confirmar la herencia de la enfermedad. Muestra un particular rédito en aquellos casos en los que:

- no exista una prueba metabólica para la afección a estudio
- no se haya podido llegar al diagnóstico a través de paneles de genes
- coexistan varios genes implicados en la enfermedad
- el fenotipo no se asocie a ninguna patología descrita con anterioridad.

Esta tecnología, al analizar una pequeña parte del genoma, ha mostrado una mayor precisión y rapidez frente al WGS; además de un menor coste en análisis y almacenamiento de datos. Sin embargo, no incluye regiones no codificantes del genoma en las que existen variedad de elementos reguladores de la expresión génica, que también pueden asociarse a enfermedades.

1.2.2.2 WGS

La secuenciación del genoma completo (WGS) incluye aproximadamente el 95-98% del genoma. Resulta el método más conveniente en la detección de mutaciones en genes que no se habían asociado previamente a patologías, especialmente cuando se sitúan en regiones no codificantes. Si bien es cierto que ha disminuido mucho su coste, este sigue siendo elevado y, unido al complejo análisis que precisa, todavía hace difícil su inclusión como prueba de rutina (9).

La WGS proporciona una visión completa y de alta resolución del genoma humano, permitiendo detectar variaciones genéticas grandes y pequeñas que no es posible visualizar empleando otros enfoques diagnósticos. Además de capturar cambios raros, también incluyen aquellas alteraciones que pueden favorecer el riesgo de sufrir una patología, conocido como estado de portador, haciendo que la secuenciación del genoma completo sea una gran prueba para detectar factores genéticos subyacentes a enfermedades complejas.

1.2.2.3 ENFOQUE EN TRÍOS

La aproximación en tríos consiste en examinar las muestras del caso índice y de ambos padres biológicos, siempre que sea posible. Esto aumenta el rendimiento analítico de las pruebas y permite filtrar variantes de *novo* presentes sólo en el bebé, confirmar el patrón de herencia de la enfermedad, así como identificar variantes raras benignas. Todo esto, ofrece un aumento sustancial de la probabilidad de obtener un diagnóstico exacto en a una velocidad mucho mayor (10).

1.3 CONCEPTO DE NBS

El cribado neonatal (NBS, por sus siglas en inglés) es un programa de salud pública que nace a finales de la década de los 60 de la mano del microbiólogo estadounidense Robert Guthrie para la detección de la fenilcetonuria (PKU) (11), una condición hereditaria rara que provoca la acumulación de un aminoácido llamado fenilalanina en el cuerpo; cuya clínica no es evidente en el nacimiento pero que provoca daños irreversibles, sobre todo a nivel del SNC; o la muerte si no se trata precozmente (12). Con el paso del tiempo, se han ido desarrollando más pruebas de laboratorio, destacando principalmente las pruebas para la detección del hipotiroidismo congénito (HC). La PKU y el HC son las dos patologías principalmente cribadas. Se realiza en todo mundo, beneficiándose aproximadamente 140 millones de recién nacidos al año (13), con el fin de detectar anomalías congénitas graves. Ha ido evolucionando desde un desarrollo inicial de pruebas individuales para cada patología hasta la implementación de la espectrometría de masas “en tándem” (MS/MS), que permite el análisis de múltiples metabolitos en una misma determinación.

El objetivo del NBS es, por tanto, identificar a los recién nacidos presintomáticos con patologías cuyo tratamiento precoz evitaría un evento fatal. Está dirigido hacia una población frágil y se rige por los cuatro principios de la bioética: autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia.

1.3.1. NBS ACTUAL: METABÓLICO

El NBS actual es un cribado bioquímico que radica en un análisis de sangre obtenido de gotas de sangre seca extraídas del talón del recién nacido, entre las 48-72 horas posteriores al nacimiento, en busca de alteraciones en marcadores bioquímicos para ciertas enfermedades predeterminadas (13). Después de varios años de lenta progresión, a principios de los años 90, se instauró la mencionada anteriormente MS/MS, enfocada fundamentalmente hacia el cribado de acidurias orgánicas, aminoacidopatías y déficit de la β -oxidación mitocondrial. Esta técnica, consistente en una tecnología multimetabolito, posibilita realizar un “perfil metabólico” en la misma muestra de sangre en papel, permitiendo descartar al menos 32 enfermedades metabólicas hereditarias (EMH O EIM), según la Asociación Española de Pediatría (AEPED).

Los trastornos examinados en el cribado actual son, en su mayoría, raros y de base genética y su diagnóstico precoz evitaría, además de secuelas irreversibles o la muerte a través de un manejo rápido y a tiempo; la “odisea diagnóstica” a la que son sometidos los padres hasta poner nombre a la enfermedad que padecen sus hijos (14).

Se emplea en muchos países, variando el número de trastornos incluidos debido a diferentes factores como la prevalencia de la enfermedad en dicho territorio, la disponibilidad de tratamiento, etc; si bien es cierto que, desde la introducción del cribado neonatal ampliado, se han tenido que reconsiderar los criterios de inclusión. La prevalencia, factor clave previamente a la introducción de la MS/MS, ha pasado a un segundo plano cuando se trata de trastornos con alto grado de morbimortalidad y que son potencialmente tratables. Estos factores son considerados a nivel nacional bajo los principios éticos de Wilson y Jungner (Tabla 1), quienes publicaron en 1968 los “10 principios” para evaluar los programas de screening, ampliamente empleados desde entonces. Evalúan como criterios de inclusión la severidad e historia natural de la enfermedad, la disponibilidad de un tratamiento eficaz y disponible; y la existencia de una prueba fiable y con criterios diagnósticos consensuados capaz de detectar la patología en una fase presintomática.

Tabla 1. Resumen de los criterios de Wilson y Jungner (15)

Principio	Explicación adicional de Wilson y Jungner
La condición buscada debe ser un problema de salud importante.	No depende solo de la prevalencia; se debe considerar desde el punto de vista del individuo y de la comunidad.

Cribado genético neonatal: aspectos técnicos, éticos y psicosociales

Debe haber un tratamiento aceptado para los pacientes con enfermedad reconocida.	Quizá el criterio más importante. Requiere responder 2 preguntas: 1) ¿El tratamiento efectivo en el estadio límite presintomático de una enfermedad afecta su curso y su pronóstico) y 2) ¿El tratamiento de la condición clínica desarrollada en una etapa temprana a la normal afecta a su curso y pronóstico? Si la 1) no es claramente afirmativa no hay caso para el cribado.
Deben disponerse de instalaciones adecuadas para diagnóstico y tratamiento.	Debe contar con instalaciones disponibles para el diagnóstico y tratamiento de las personas que se encuentren positivas mediante el cribado.
Debe haber una fase latente reconocible o temprana sintomática.	Debe ser un período razonable asintomático en la historia natural de la condición.
Debe haber una prueba o examen adecuado.	La prueba debe ser fácil y rápida, aunque puede ser menos sensible y específica que una prueba de diagnóstico. En una prueba de cribado, se puede aceptar una tasa de falsos positivos mayor. Sin embargo, una alta tasa de falsos negativos no sería aceptable.
La prueba debe ser aceptable para la población.	La aceptabilidad está relacionada con la naturaleza del riesgo involucrado y en la medida en que “el terreno está preparado previamente por la educación sanitaria”.
La historia natural de la enfermedad, incluyendo el desarrollo de la enfermedad latente a la declarada, debe ser adecuadamente entendida.	Es necesario haber realizado suficiente investigación para saber 1) ¿Qué cambios deben considerarse patológicos y qué se deben considerar variaciones fisiológicas? Y 2) ¿Los cambios patológicos tempranos son progresivos?
Debe haber una política acordada sobre a quién tratar como paciente.	¿Existe un tratamiento eficaz que puede detener o revertir los cambios patológicos tempranos? Es posible que no sepamos la respuesta a esta pregunta porque no se han realizado ensayos controlados aleatorios de detección o tratamiento. Debemos tener cuidado y prestar atención al principio hipocrático de <i>primum non nocere</i> (lo primero es no hacer daño). Hay un problema por el cual se encuentran personas mediante el cribado que no son claramente normales ni anormales. Es importante tener una política clara para el tratamiento o el seguimiento de estas personas.
El costo de la búsqueda de un caso (incluido el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes diagnosticados) debe estar equilibrado desde el punto de vista económico en relación con los posibles gastos en atención médica en su conjunto.	Hay dos objetivos generales de la detección: mejorar la salud y reducir los costos. No es seguro que el cribado reducirá los costos; Hay una necesidad de ensayos controlados aleatorios de detección para determinar esto, aunque estos ensayos son difíciles de llevar a cabo.
La búsqueda de casos debe ser un proceso continuo y no un proyecto de “una vez por todas”.	El beneficio de la detección “de una sola ocasión” es limitado.

Tabla adaptada de: Reconsidering the criteria for evaluating proposed screening programs: reflections from 4 current and former members of the U.S. Preventive services task force. *Epidemiol Rev.* 2011; 33:20-35. (<https://academic.oup.com/epirev/article/33/1/20/491396?login=false>)

Cada país establece, a partir de los criterios mencionados, qué condiciones se deben introducir en el NBS. En Estados Unidos, por ejemplo, se guían por el Panel Uniforme Recomendado de detección (RUSP) (Tabla 2) (16). Este, divide las

enfermedades en dos grupos principales: las patologías primarias, que se recomienda su inclusión en todos los programas de cribado de recién nacidos; y las patologías secundarias, para las cuales no está diseñado específicamente, pero es posible su detección dentro del examen de una enfermedad principal. Cada estado, por tanto, emplea el RUSP para decidir qué trastornos incluir en sus programas de cribado neonatal.

No obstante, existen varios trastornos como la galactosemia clásica (17) o la tirosinemia tipo 1 (18) para los cuales existen tasas relativamente elevadas de falsos positivos; que derivan en una preocupación innecesaria para los padres. Por otra parte, hay condiciones cuya introducción en la NBS se ve limitada por la inexistencia de metabolitos disponibles para su cribado (19). También existen otras patologías consideradas inicialmente suficientemente graves para ser incluidas en el cribado neonatal pero que se han demostrado benignas, como la deficiencia de Acil Co-A deshidrogenasa de cadena corta (20,21).

A pesar de que, en líneas generales, el NBS metabólico es considerado un avance importantísimo a nivel de salud pública, también asocia consecuencias no deseadas tanto a nivel del recién nacido en forma de iatrogenia al tratar en exceso a bebés con un fenotipo dudoso; como a nivel materno y paterno causando estrés y preocupación innecesaria a los que reciben un resultado falso positivo. Además, existe la creciente necesidad de incluir más trastornos en el NBS debido a que, entre 2006 y 2022, el número de condiciones recomendadas en el RUSP para el cribado neonatal aumentó solamente de 27 a 35, y el número de recién nacidos afectados identificados para estas se mantuvo prácticamente invariable (13). Sin embargo, cada vez hay más condiciones raras de etiología genética conocida con un difícil diagnóstico, pero al mismo tiempo con tratamientos dirigidos precoces y esperanzadores (19).

Tabla 2. Trastornos primarios incluidos en el RUSP

PATOLOGÍAS PRIMARIAS	T. metabolismo de los ácidos orgánicos	T. metabolismo de los ácidos grasos	T. metabolismo Aminoácidos	T. endocrinos	T. hemoglobina	Otros
Acidemia Propiónica	X					
Acidemia metilmalónica (metilmalonil-CoA mutasa)	X					
Acidemia metilmalónica (metabolismo de cobalaminas)	X					
Acidemia Isovalérica	X					
Deficiencia en 3-metilcrotolil-CoA carboxilasa	X					
Aciduria 3-OH-3 metilglutárica	X					
Deficiencia en holocarboxilasa sintetasa	X					

Cribado genético neonatal: aspectos técnicos, éticos y psicosociales

Deficiencia en β -cetotilasa	X					
Aciduria glutárica tipo I	X					
Deficiencia en la captación celular de la carnitina		X				
Deficiencia en la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media		X				
Deficiencia en la acil-CoA deshidrogenasa de cada muy larga		X				
Deficiencia en la 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga		X				
Deficiencia de la proteína trifuncional mitocondrial		X				
Aciduria Argininosuccínica			X			
Citrulinemia tipo I			X			
Enfermedad de jarabe de arce			X			
Homocistinuria			X			
Fenilcetonuria			X			
Tirosinemia tipo I			X			
Deficiencia en la guanidinoacetato metiltransferasa			X			
Hipotiroidismo congénito primario				X		
Hiperplasia adrenal congénita				X		
Enfermedad S, S					X	
S, β -Talasemia					X	
Enfermedad C, S					X	
Deficiencia de biotinidasa						X
Cardiopatía congénita crítica						X
Fibrosis Quística						X
Galactosemia clásica						X
Enfermedad de Pompe						X
Pérdida auditiva						X
Inmunodeficiencia severa combinada						X
Mucopolisacaridosis tipo I						X
Adrenoleucodistrofia ligada a X						X
Atrofia muscular espinal						X
Mucopolisacaridosis tipo II						X

Tabla de elaboración propia basada en la escrita por el colegio Americano de Genética Médica (ACGM) y encargada por la Administración de Recursos y Servicios de Salud (HRSA). Recommended Uniform Screening Panel (17). Disponible en: <https://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/recommendedpanel/index>

[.html](#) En morado se encuentran señalados los trastornos incluidos en la cartera básica común del SNS de España.

Todas las limitaciones que presenta el cribado neonatal bioquímico actual y la reducción de los costos de la secuenciación del genoma y exoma completos (22) han llevado a plantearse la NGS como técnica para superar dichas barreras.

1.3.2. NBS GENÓMICO: NGS

En el año 2003, el National Health Service (NHS) de Reino Unido proclamó la idea de “secuenciar a los recién nacidos”, obteniendo un mapa genético completo, y archivarlo en la historia clínica del paciente con el fin de poder usarlo a lo largo de toda la vida. Francis Collins, quien dirigió el Proyecto Genoma Humano, ha expresado su creencia acerca del beneficio de secuenciar a todos los recién nacidos, siendo esto un punto angular dentro de la medicina genómica de las 4P: personalizada, predictiva, preventiva y participativa (23).

El conocimiento del mapeo del genoma humano junto con el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación, expuestas anteriormente; así como la reducción del coste de estas, han abierto la puerta hacia el manejo clínico y personalizado de los pacientes que padecen enfermedades raras, que son en un 80% de base genética (23).

La NGS actual permite la secuenciación rápida del ADN y ARN, mostrando una cantidad enorme de información en poco tiempo. Ha abierto un mapa de oportunidades para la mejora del cuidado y tratamiento precoz del recién nacido, ya que permitiría ampliar el número de condiciones con posibilidad de detección y podría identificar el riesgo de estas en bebés asintomáticos al nacimiento; evitando así ciertas limitaciones del cribado actual, como la disponibilidad de biomarcadores específicos. También podría reducir la “odisea diagnóstica” de los recién nacidos enfermos al permitir un diagnóstico mucho más precoz, junto con un adecuado tratamiento (14). Además, ofrece información farmacogenómica con capacidad para la creación de estrategias óptimas de tratamiento. Por último, proporciona información sobre el estado de portador que podría servir de ayuda en la planificación reproductiva familiar, e información sobre predisposiciones para futuras enfermedades de inicio en la adultez, potencialmente tratables, con la posibilidad de reevaluación de la información (24).

Actualmente y a nivel mundial, solamente se utiliza la secuenciación del genoma completo en los recién nacidos como método secundario de confirmación, aunque los expertos afirman que podría ser laudable su utilización a gran escala y como primera prueba en un futuro próximo (25). De hecho, los laboratorios ofertan cada vez más la secuenciación genómica (tanto del genoma como del exoma completos); acercándose cada vez más a su uso en patología neonatal.

1.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

La inclusión del cribado genómico neonatal, destinado a población asintomática y vulnerable debe regirse por dos principios primordiales: “no hacer daño” y “actuar en el mejor interés para el recién nacido” (26).

En la práctica clínica habitual se da prioridad al principio de autonomía-que conlleva privacidad y confidencialidad-, además de la beneficencia, la no maleficencia y la justicia; que conforman los cuatro principios bioéticos de la medicina. Sin embargo, dado que el cribado forma parte de los Sistemas de Salud Pública, la comisión de ética de la Asociación Española de Genética Humana (AEGH) puntualiza que también hay que tener en cuenta los principios específicos de la misma: la transparencia, el utilitarismo, la eficiencia y la equidad o proporcionalidad.

El cribado genético neonatal, con el uso de la NGS, podría llevar implícitos otros aspectos éticos y legales a mayores. Por un lado, por la propia naturaleza de la prueba y, por otro, por la cantidad de información que genera; mucha de la cual no tiene utilidad clínica momentánea, sino que se trata de hallazgos incidentales no relacionados con los objetivos de la prueba, muy difíciles de gestionar en términos éticos. Sin embargo, estos resultados pueden tener valor médico relevante.

La presentación de resultados incidentales o secundarios a partir de la secuenciación del genoma o exoma completos ha abierto un debate acerca de si debieran ser informadas o no. Esto es todavía más notable en la población pediátrica debido a la incapacidad de decisión de estos pacientes en el momento del examen, que se irán haciendo legalmente competentes con el crecimiento (27). Todo esto ha llevado a plantearse la necesidad de realización de un asesoramiento genético pre-cribado tanto a padres como a profesionales (26), así como la firma de un consentimiento informado tras dicha educación genética (12).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es obtener la evidencia disponible hasta la fecha acerca de los aspectos técnicos, éticos y psicosociales de la implementación del cribado genético neonatal como prueba de primer nivel. Para ello se realizará una revisión sistemática sobre los cribados genéticos neonatales que se han llevado a cabo a nivel mundial empleando diferentes técnicas de secuenciación masiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica, principalmente en la base de datos “PubMed” y complementada con registros encontrados en “Cochrane” y “Dialnet”. Se realizó, en primer lugar, una búsqueda genérica incluyendo las palabras “genomic” y “newborn screening” utilizando entre ambas el operador booleano “AND”. Una vez realizada, los resultados obtenidos de la búsqueda se cribaron por criterios de inclusión, mediante el empleo de los filtros de “PubMed”: fecha de publicación (enero de 2002 a diciembre de 2022), presencia de abstract, estudios realizados exclusivamente en humanos y no en otros animales, registros en inglés o español y edad (recién nacidos, desde el nacimiento hasta 1 mes).

Para los criterios de inclusión y exclusión en los que se basó la búsqueda, utilizamos el sistema PICO:

- *P (patient)*: neonatos (recién nacidos hasta 1 mes de edad) sanos y neonatos críticamente enfermos.
- *I (intervention)*: cribado genético neonatal como prueba de primer nivel.
- *C (comparison)*: diferentes técnicas de secuenciación NGS en cribado genético neonatal.
- *O (outcome)*: rentabilidad diagnóstica de las diferentes técnicas de secuenciación en cribado genético neonatal.

Posteriormente, se realizó un cribado cualitativo por relevancia de título y abstract. En cuanto a los artículos descartados por irrelevancia de abstract se excluyeron: (i) las revisiones sistemáticas y los comentarios de expertos; (ii) los artículos que hiciesen alusión al cribado genético neonatal como prueba confirmatoria de segundo nivel; (iii) documentos que cribasen una patología genética concreta (por ejemplo, la atrofia muscular espinal o la inmunodeficiencia combinada grave) y (iv) aquellos registros que mostrasen el NGS como prueba diagnóstica y no de cribado. Más tarde, se cribaron los artículos cualitativamente a texto completo y se descartaron: (v) estudios retrospectivos y (vi) artículos relacionados con estudios incluidos en la revisión pero que no aportasen información adicional para los resultados. Además, se revisaron manualmente algunas citas de los estudios seleccionados que pudieran aportar información de valor al análisis,

alguno de los artículos excluidos resultó útil para enriquecer la discusión y las conclusiones.

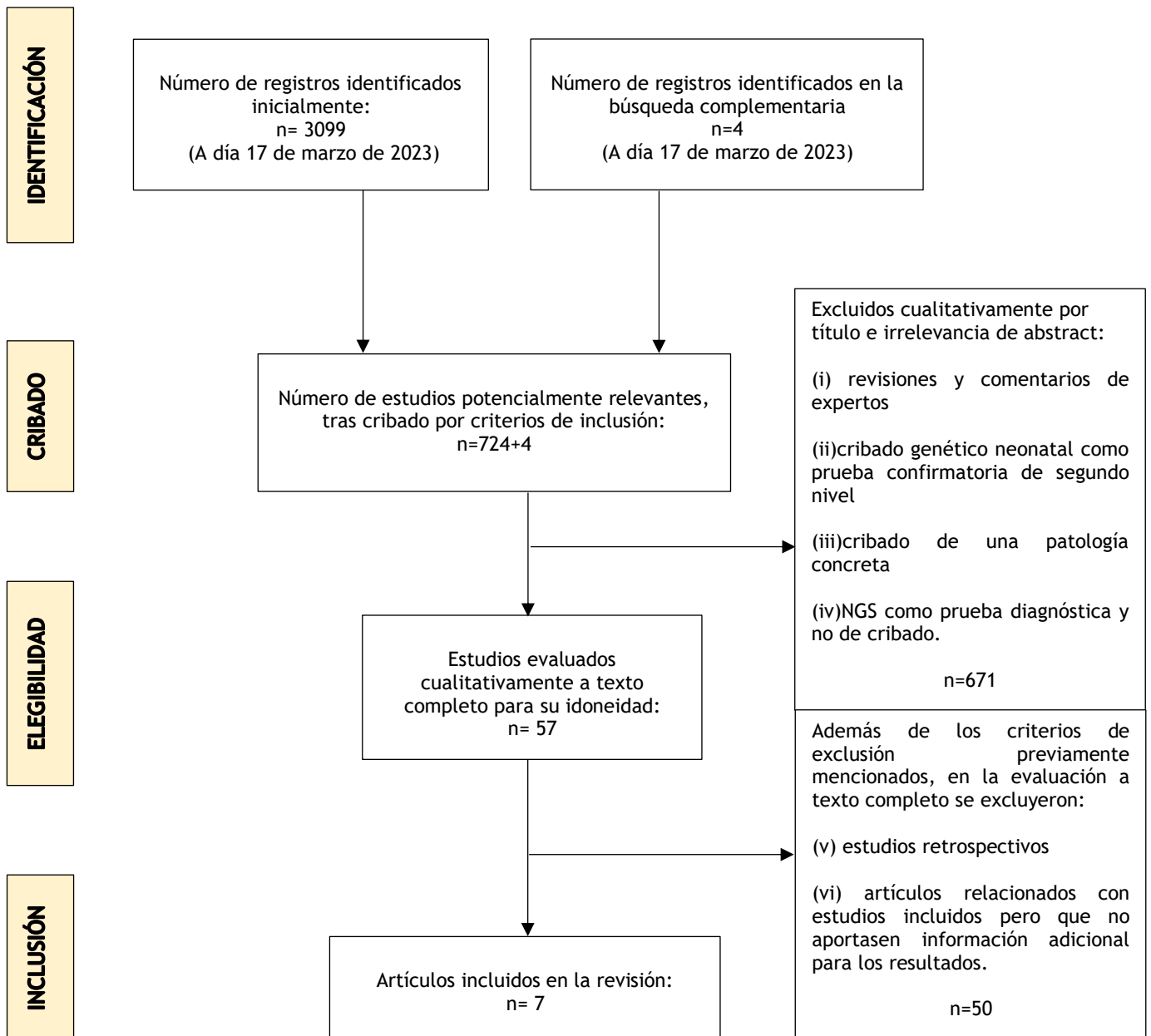


Figura 2. Diagrama de flujo PRISMA

RESULTADOS

Para obtener resultados acerca de los factores que hay que tener en cuenta sobre la implementación de los diferentes tipos de NGS en el cribado neonatal como prueba de primer nivel, hemos analizado diversos estudios. Dentro de ellos destacan dos proyectos, que son los más reconocidos y extendidos actualmente; y que forman parte del consorcio Newborn Sequencing in Genomic and Public Health (NSIGHT). Son el Proyecto BabySeq y el North Carolina Newborn Exome Sequencing for Universal Screening (NC NEXUS).

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS

Las tablas 3, 4 y 5 resumen las características principales de los 7 (28-34) estudios incluidos en la revisión. Todos ellos fueron publicados entre los años 2016 y 2021. La edad de la población objeto de estudio abarca desde el nacimiento hasta el mes de edad, si bien es cierto que se hace referencia a la evolución de algunos pacientes de mayor edad, con el fin de examinar si las variantes patogénicas identificadas tenían un papel importante en el curso de la enfermedad.

Atendiendo a los métodos de secuenciación empleados, dentro de los 7 estudios finalmente incluidos, se ha utilizado WES o ES en tres de ellos (tabla 3); WGS en uno (tabla 4); y un panel multigénico o un panel de genes dirigido (tabla 5) en otros tres estudios.

(a) WES O ES:

Ceyhan-Birsoy et al. (28) llevaron a cabo el Proyecto BabySeq, un ensayo clínico controlado y aleatorizado cuyo objetivo principal es “explorar el impacto médico, conductual y económico” asociado a la secuenciación masiva en el cribado neonatal. Para ello, se seleccionaron dos cohortes: una de recién nacidos sanos del Brigham and Woman’s Hospital (BWH), en la que se reclutaron 127 sujetos; y otra de ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del BWH, Boston Children’s Hospital (BCH) y el Massachusetts General Hospital (MGH), en la cual se alistaron 32 individuos. Dentro de cada cohorte los participantes se aleatorizaron en dos brazos: uno de control, donde recibieron atención estándar y asesoramiento genético; y otro brazo de secuenciación genómica en el que recibieron NGS, además de la atención estándar y el asesoramiento. Todas las variantes informadas fueron confirmadas por una técnica ortogonal, en este caso, la secuenciación de Sanger.

Los resultados se mostraron en un informe de secuenciación genómica de recién nacidos (NGSR). Además, se incorporó un análisis basado en indicaciones (IBA) para los recién nacidos con manifestaciones clínicas específicas en el cual. Dentro del NGS, se reflejaron tres grupos de resultados: (i) riesgo de enfermedades monogénicas con

presentación en la edad infantil, (ii) estado de portador y (iii) genes asociados a información farmacogenómica (PGx) relevante. Además, un grupo de padres, escogidos al azar, tuvieron la posibilidad de conocer información sobre el riesgo de ciertas enfermedades procesables de inicio en la adultez.

Dentro del NGS, se informaron variantes P/LP con riesgo de enfermedades monogénicas de inicio en la infancia en **15 de 159** (9,4%) recién nacidos y riesgo de enfermedades de inicio en la edad adulta en el 3,5% de los participantes, así como variantes en genes asociados con información PGx de interés en **8 de 159** sujetos. Además, **140 de 159** (88%) recién nacidos presentaron al menos una variante asociada al estado de portador. En cuanto al IBA, no se encontraron hallazgos definitivos de interés en ninguna de las dos cohortes.

Roman et al. (29) dirigieron el Proyecto NC NEXUS, en el que se analiza el empleo de la secuenciación del exoma en el contexto del cribado neonatal y se evalúa la respuesta de los padres a la misma. Se emplearon dos cohortes de bebés: una de recién nacidos sanos y otra de niños ya diagnosticados previamente gracias a los métodos de NBS actuales. En total, se reclutaron 106 sujetos: 17 ya diagnosticados con errores congénitos del metabolismo y 28 previamente diagnosticados con pérdida auditiva. Además, se alistaron madres en el período prenatal; que posteriormente dieron a luz a 61 bebés, clasificados en la cohorte de niños sanos.

Para facilitar la interpretación de resultados, los expertos examinaron los datos de ES empleando un panel de 466 genes, para analizar así su papel en la enfermedad, el modo de herencia, la penetrancia y la edad de inicio estimada. En un primer momento, la cohorte del recién nacido estaba cegada al investigador para no condicionar los resultados del estudio. Posteriormente, fue revelada a los analistas; y los datos de los sujetos de la cohorte metabólica o de la de pérdida auditiva se estudiaron más en detalle a través de una “lista de genes de diagnóstico” asociadas al fenotipo específico, que formaba parte de un IBA.

En el análisis NGS-NBS global, donde se incluyeron los hallazgos de la cohorte de niños sanos y aquellos revelados en niños pertenecientes a las cohortes de enfermos, pero no filiados a su diagnóstico, resultaron positivos **4 de 106** (3,77%) sujetos, uno en la cohorte de bebés sanos, y tres en la de recién nacidos enfermos. Analizando los resultados de cada cohorte individualmente, **15 de 17** (88%) participantes de la cohorte metabólica obtuvieron variantes en genes relacionados con sus respectivas patologías. El análisis de la cohorte de pérdida auditiva resultó positivo en **5 de 28** (18%) lactantes. Por último, 2 de los 65 (3,07%) sujetos que se aleatorizaron para recibir hallazgos genómicos adicionales, presentaron variantes en genes filiados a enfermedades de inicio en la adultez, y en otro se informó una variante en un gen asociado a un síndrome de inicio en la infancia, pero no tratable. Además, se detectaron 109 posibles hallazgos relacionados con el estado de portador. Concluyeron que el NGS, en el contexto de NBS, no puede reemplazar completamente a las técnicas bioquímicas y a la confirmación basada en el

fenotipo debido, principalmente, a la heterogeneidad etiológica de las enfermedades genéticas y los desafíos existentes en cuanto a la interpretación de variantes.

Boemer et al. (30) realizaron un estudio piloto en quince sujetos con EMH diagnosticadas previamente con el objetivo de demostrar el potencial de NGS, concretamente WES en gotas de sangre seca (DBS), en la detección de mutaciones patogénicas en genes relacionados con dichos trastornos. Una vez obtenidos los resultados, se compararon con mutaciones ya conocidas identificadas por secuenciación de Sanger.

En dos de los recién nacidos, no se identificó ninguna variante que explicase su enfermedad, aunque en uno de ellos finalmente se identificó una variante sugestiva de la misma; y en otro de ellos se identificaron correctamente cuatro de las cinco mutaciones que presentaba en el gen asociado a su patología. Por último, en uno de los participantes, se encontró un hallazgo patogénico adicional.

(b) WGS:

Bodian et al. (31) efectuaron un análisis de una cohorte de 1.696 recién nacidos de diversas etnias que incluía lactantes enfermos, prematuros y, predominantemente, sanos a término; para examinar el potencial de la NGS en las pruebas rutinarias de cribado neonatal. En cada sujeto se analizaron 163 genes relacionados con trastornos incluidos en el RUSP, y se compararon los resultados obtenidos con los del NBS estatal del Commonwealth of Virginia (VA).

Aunque en términos generales se observó buena concordancia entre ambos resultados, hubo 513 para los cuales no se mostró correspondencia entre WGS y NBS convencional; siendo el 80% resultados genómicos inciertos, aunque solamente el 24,1% de predice que será perjudicial a través del enfoque en tríos; el 16% falsos positivos de NBS rutinario y el 3% falsos positivos de NGS, observándose por tanto una reducción considerable de falsos positivos respecto a la técnica estándar.

(c) PANELES DE GENES:

Wang et al. (32) realizaron un estudio controlado en el que reclutaron tres cohortes compuestas de: (i) 36 casos positivos verdaderos (VP), (ii) 60 falsos positivos (FP) y (iii) 100 casos negativos (VN), analizados mediante MS/MS-NGS; de los cuales se analizaron las DBS con un panel de genes denominado Neoseq, basado en secuenciación de amplicones por PCR multiplex (MTA-Seq).

El NeoSeq identificó correctamente a **20 de 36** (55,56%) sujetos del grupo de VP. Además, y pese a las limitaciones técnicas del panel, el tiempo de respuesta (TAT) descendió desde una mediana de 43 días con el MS/MS-NGS hasta 10 días con el NeoSeq. Dentro del grupo de FP, se redujo el número de los 60 identificados erróneamente

mediante NBS tradicional a tres resultados falso-positivos establecidos por el panel de este estudio. Por último, se identificaron hallazgos adicionales en dos bebés del grupo de VN; además de una tasa de estado de portador de 41 de 160 sujetos en las cohortes de FP y VN.

Park KJ et al. (33) llevaron a cabo un estudio en el que desarrollaron un panel multigénico para evaluar la aplicación de un modelo integrado, basado en pruebas bioquímicas y NGS llamado NewbornSeq, en un entorno de cribado neonatal rutinario; determinando su potencial sensibilidad y especificidad, para lo cual emplearon dos cohortes: una formada por 27 sujetos positivos mediante pruebas bioquímicas y confirmados mediante secuenciación de Sanger; y otra de 10 participantes negativos, correspondientes a voluntarios sanos o con otras patologías no estudiadas mediante NBS convencional. Además, también realizaron un estudio poblacional en 120.700 recién nacidos, con el fin de analizar las características epidemiológicas de los trastornos genéticos en la población coreana; y se evaluaron, a mayores, 269 DBS de casos positivos en el NBS rutinario, agrupados en 3 cohortes de acuerdo con los resultados obtenidos: (i) 59 casos en el grupo APC (asociación entre bioquímica y mutaciones), (ii) 125 casos en el grupo PCD (discrepancia entre las mutaciones y las anomalías en los metabolitos) y (iii) 85 en el grupo PPC (solamente mostraron anomalías metabólicas).

En el conjunto de población, se consideró una tasa positiva de EMH detectada a través del modelo integrado de aproximadamente el 20%. El NewbornSeq demostró, además, una sensibilidad y especificidad del 100% para las 97 variantes patogénicas analizadas en los 27 sujetos positivos. Además, el TAT descendió de diecisiete días con el método de Sanger a cinco días con el panel de este estudio.

El objetivo del estudio realizado por **Peng Q et al.** (34) fue detectar diversos trastornos genéticos en recién nacidos a través de la implementación de un panel NGS específico, consistente en un panel de genes dirigido hacia 104 genes de los cuales se conoce su relación con trastornos genéticos. Se dividió en dos cohortes: 25 participantes sanos y 32 sujetos enfermos reclutados del Hospital Infantil de Dongguan, en China. Todos los recién nacidos habían sido diagnosticados a través del NBS convencional, después del cual se recolectaron DBS; y previamente al estudio se confirmaron las muestras mediante secuenciación de Sanger.

Se identificaron 8 variantes patogénicas y 20 SNVs en las muestras de los 32 sujetos enfermos consiguiendo, por tanto, un rendimiento analítico del 100%.

Tabla 3. Tabla resumen de los estudios que emplearon WES o ES como método de secuenciación

Referencias [año]	n	Grupos de intervención (cohortes)	Tipo de estudio	Panel	Resultados	Conclusiones
Boemer et al. [2017] (30)	15	Sólo analizaron una cohorte de RN enfermos	Estudio piloto	Se centraron en 35 genes. A mayores examinaron otros 74.	En uno de los recién nacidos no se identificó ninguna mutación relacionada con su patología, MSUD. En otro, resultó muy complicado reconocer una variante que explicase la causa de su enfermedad. Además, en un neonato con diagnóstico de galactosemia, se identificaron correctamente 4 de las 5 mutaciones presentes en uno de sus alelos. Por último, en un bebé se identificó, además de la mutación en <i>FAH</i> , que explica su tirosinemia tipo I; una variante homocigota adicional e inesperada en el gen <i>DUOX2</i> que, tras los controles analíticos de seguimiento, se demostró clínicamente irrelevante.	Este estudio ha disminuido la sensibilidad respecto al NBS convencional. Además, como se informó en uno de los sujetos, cabe destacar los hallazgos incidentales inesperados encontrados en el mismo.
Ceyhan-Birsoy et al. [2019] (28)	159	<u>G1</u> : niños sanos (n=127) <u>G2</u> : niños críticamente enfermos (n=32)	RCT BabySeq	954 genes	<u>G1</u> : se identificaron variantes P/LP con riesgo de enfermedad monogénica de inicio en la infancia en 10 RN. Además, se detectó una variante P en el gen <i>BRCA2</i> , relacionado con mayor riesgo de una enfermedad de inicio en la adultez. <u>G2</u> : se informaron variantes P/LP con riesgo de enfermedad monogénica de inicio en la infancia en 5 RN; y se identificaron dos niños con dos variantes en los genes <i>BRCA2</i> y <i>MSH2</i> , respectivamente, que confieren mayor riesgo de enfermedad de inicio en la edad adulta. En ninguno de los 15/159 participantes con riesgo de enfermedad de inicio en la infancia podría haberse anticipado el riesgo en función de los antecedentes clínicos o familiares conocidos de los RN.	Los resultados muestran que el WES podría aumentar el espectro de patologías detectables respecto a las incluidas en el NBS actual, aunque la identificación de ciertas variantes, como las relacionadas con el estado de portador, podrían no proporcionar beneficio adicional a los sujetos.

		Además, 140 de 159 (88%) sujetos presentaron, al menos, una variante asociada al estado de portador.	
Roman et al. [2020] (29)	106	<p><u>GI1</u>: RN sanos (n=61)</p> <p><u>GI2</u>: cohorte metabólica (n=17)</p> <p><u>GI3</u>: cohorte de pérdida auditiva (n=28)</p>	<p>RCT</p> <p>NC NEXUS</p> <p>466 genes</p>
	<p><u>GI1</u>: se identificó un neonato heterocigoto para una variante <i>missense</i> en <i>LDLR</i>. En cuanto a los hallazgos genómicos adicionales, se identificó una variante heterocigota en el gen <i>BRCA2</i> en un RN.</p> <p><u>GI2</u>: En la cohorte metabólica, se identificaron correctamente el 88% de los RN. Los dos restantes, negativos inicialmente, fueron estudiados más en detalle cuando se reveló la cohorte; identificándose, en ambos, variantes sugestivas de sus patologías. Además, en el análisis global NGS-NBS una bebé diagnosticada de PKU, resultó ser portadora de una variante en el gen <i>OTC</i>.</p> <p><u>GI3</u>: 5 de 28 RN resultaron positivos. Tras desvelar la cohorte al analista, se identificaron cinco posibles hallazgos causantes de patología auditiva en otros 5 RN. Además, en el análisis NGS-NBS global, dos bebés de esta cohorte mostraron variantes para los genes <i>DSC2</i> y <i>F11</i>.</p> <p>Por último, y en términos generales, se detectaron 109 posibles hallazgos relacionados con el estado de portador.</p>		<p>NGS, en el contexto de NBS, no puede reemplazar al completo a las pruebas bioquímicas y a la confirmación basada en el fenotipo, debido a la heterogeneidad etiológica de las enfermedades genéticas y al desafío que existe en cuanto a la interpretación de variantes.</p>

WES: secuenciación del exoma completo; ES: secuenciación del exoma; GI1: grupo de intervención 1; GI2: grupo de intervención 2; GI3: grupo de intervención 3; n: tamaño muestral; RCT: ensayo clínico controlado aleatorizado; P/LP: patogénica/ probablemente patogénica; RN: recién nacido; NGS: secuenciación de próxima generación; NBS: cribado neonatal; PKU: fenilcetonuria; MSUD: enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce.

Tabla 4. Tabla resumen del estudio que empleó WGS como método de secuenciación

Referencias [año]	n	Grupos de intervención (cohortes)	Tipo de estudio	Panel	Resultados	Conclusiones
Bodian et al. [2016] (31)	1969	G1: recién nacidos sanos G2: bebés afectados	-	163 genes	<p>Un total de 750 recién nacidos (44%), no mostraron variantes patógenas en ninguno de los genes de NBS.</p> <p>G1: El WGS identificó correctamente a 77 y 6 sujetos que habían sido clasificados como falsos positivos y no concluyentes, respectivamente, en el NBS convencional.</p> <p>G2: WGS sólo identificó correctamente a dos de los cinco (40%) neonatos que habían resultado positivo en NBS estatal. Además, informó 17 falsos positivos, la mayoría debidos a mutaciones informadas como probablemente patógenas en el gen <i>DUOX2</i>.</p> <p>Por último, WGS mostró 410 resultados como inciertos, correspondiendo el 88% a variantes en genes asociados con enfermedades autosómicas dominantes.</p>	<p>En términos generales se observó buena concordancia, pero hubo 513 para los cuales no se mostró correspondencia entre WGS y NBS convencional, siendo el 80% resultados genómicos inciertos; el 16% falsos positivos de NBS rutinario y el 3% falsos positivos de NGS, observándose por tanto una reducción considerable de falsos positivos respecto a la técnica estándar.</p>

G1: grupo de intervención 1; G2: grupo de intervención 2; n: tamaño muestral; WGS: secuenciación del genoma completo; NBS: cribado neonatal; NGS: secuenciación de próxima generación.

Tabla 5. Tabla resumen de los estudios que emplearon un Panel de genes como método de secuenciación

Referencias [año]	n	Grupos de intervención (cohortes)	Tipo de estudio	Panel	Resultados	Conclusiones
Park KJ et al. [2016] (33)	37 269 DBS positivas	<u>G1</u> : participantes negativos (n=10) <u>G2</u> : sujetos positivos mediante pruebas bioquímicas (n=27) <u>G3</u> : 269 DBS de casos positivos de 120.700 RN	Cohortes (NewbornSeq)	97 genes en relación con enfermedades del DBS coreano en el grupo G2.	<u>G1</u> : El rendimiento analítico en cuanto a la clasificación correcta de los 10 controles fue del 100%. <u>G2</u> : El NewbornSeq demostró una sensibilidad del 100% para las 97 variantes P analizadas en los 27 sujetos positivos. <u>G3</u> : Los resultados de este grupo se dividieron en 3 categorías: APC, PCD y PPC. Se validaron 54 de 59 casos (91,5%) en el grupo APC, con mutaciones en genes relacionados con sus anomalías metabólicas, entre los que destacan <i>DUOX2</i> o <i>DUOX2</i> , <i>SLC25A13</i> o en <i>GALE</i> . Además, se identificaron 10 casos con mutaciones bialélicas relacionadas con EMH en el grupo PCD. En el conjunto de la población, se consideró una tasa positiva de EMH, detectada a través del modelo integrado, de aproximadamente el 20%.	El rendimiento analítico, tanto en los controles como en los sujetos positivos, fue del 100%. Este estudio reveló hallazgos adicionales en sujetos sin alteraciones relacionadas con los mismos en los metabolitos. Además, el TAT disminuyó de 17 con el método de Sanger hasta 5 con el panel del NewbornSeq.
Peng Q et al. [2020] (34)	57	<u>G1</u> : RN sanos (n=25) <u>G2</u> : RN enfermos (n=32)	Cohortes	104 genes	<u>G1</u> : No se informó ninguna variante en el grupo de niños sanos. <u>G2</u> : Se identificaron 8 variantes P y 20 SNVs en este grupo.	Se consiguió un rendimiento analítico del 100% con el panel de genes de este estudio, concluyendo que se podría realizar un NGS fiable a partir de DBS neonatales.

Wang et al. [2021] (32)	196	<p><u>G1</u>: VP (n=36)</p> <p><u>G2</u>: FP (n=60)</p> <p><u>G3</u>: VN (n=100)</p>	Cohortes (NeoSeq)	<p>135 genes filiados a 75 enfermedades (MTA-Seq)</p>	<p><u>G1</u>: El NeoSeq identificó correctamente a 20 de 36 (55,56%) RN el grupo de este grupo.</p> <p><u>G2</u>: Frente a los 60 FP revelados mediante NBS convencional, el panel de este estudio solamente identificó tres resultados FP.</p> <p><u>G3</u>: Se identificaron dos hallazgos adicionales en este grupo, uno de ellos en un RN con una variante en el gen <i>DUOX2</i>, asociado a HC, no incluido en el NBS de China; y el otro de los neonatos presentó una mutación P heteroplásmica en el gen <i>MTTL1</i>.</p> <p>Además, entre los grupos VN Y FP se encontró una tasa de estado de portador de 41/160 sujetos.</p>	<p>El NeoSeq mostró una especificidad similar al NBS tradicional (99,4%). Sin embargo, la sensibilidad disminuyó notablemente (55,6%). Además, cabe destacar que este método es capaz de reducir de manera significativa la tasa de FP y disminuir el TAT hasta 7-10 días.</p>
-------------------------------	-----	--	----------------------	--	--	--

G1: grupo de intervención 1; G2: grupo de intervención 2; G3: grupo de intervención 3; n: tamaño muestral; RN: recién nacidos; VP: verdaderos positivos; FP: falsos positivos; VN: verdaderos negativos; DBS: gotas de sangre seca; NBS: cribado neonatal; APC: asociación entre bioquímica y mutaciones; PCD: discrepancia entre las mutaciones y las anomalías en los metabolitos; PPC: solamente mostraron anomalías metabólicas; EMH: enfermedades metabólicas hereditarias; variante P: variante patogénica; SNVs: variantes de nucleótido individuales; MTA-Seq: secuenciación de amplicones por PCR multiplex; TAT: tiempo de respuesta; HC: hipotiroidismo congénito.

DISCUSIÓN

La secuenciación genómica de nueva generación se ha convertido en una de las herramientas diagnósticas más prometedoras en el campo de la neonatología (35). Algunas de sus características principales, como la capacidad de diagnóstico con un TAT en días o su competencia para secuenciar una gran cantidad de ADN (con la consiguiente generación de mucha información) la convierten en un instrumento de especial importancia para el diagnóstico en niños gravemente enfermos (36), además de hacerla muy llamativa por su potencial en un entorno de cribado neonatal. Es importante destacar que los trastornos genéticos con inicio en la infancia, sobre todo aquellos que debutan en el período neonatal, asocian un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad; por lo que se podrían beneficiar de un diagnóstico precoz o de una detección presintomática.

A pesar de los potenciales beneficios que podría tener la NGS en un entorno de cribado neonatal, es necesario considerar los desafíos que presenta, como son la interpretación de variantes, los impactos psicosociales o los problemas éticos asociados. Si bien es cierto que las técnicas de NGS podrían aumentar considerablemente el número de enfermedades detectadas mediante cribado neonatal, a raíz del Proyecto BabySeq y los hallazgos encontrados en el mismo, se generó un debate muy controvertido sobre la identificación y divulgación de variantes genéticas incidentales o secundarias asociadas a enfermedades de inicio en la adultez o a condiciones de inicio en la infancia para las cuales no existe tratamiento (24,28).

En cuanto a las implicaciones éticas y psicosociales, los estudios incluidos en esta revisión dirigidos por Ceyhan-Birsoy et al., Roman et al., Boemer et al. y Bodian et al., que han empleado WES o WGS como técnica de secuenciación, han encontrado hallazgos incidentales o de significado incierto que avalan el desafío mencionado a la hora de considerar su divulgación; con la consecuente e innecesaria angustia generada en los padres y madres, así como el consumo de recursos empleados para su seguimiento. Por otra parte, también supone un reto la evaluación de variantes relacionadas con enfermedades de debut en la edad adulta. Durante el período neonatal, la autoridad ética y legal acerca de las decisiones médicas sobre el recién nacido recae en los padres, las cuales deben ser tomadas en favor de los intereses del bebé (37). No obstante, la decisión de obtener información sobre enfermedades de inicio en la edad adulta priva a los recién nacidos, que en el momento del examen se consideran legalmente incompetentes, pero que dejarán de serlo a medida que crecen (26); de uno de los cuatro principios de la bioética por los que se rige la medicina, el principio de autonomía, así como de la confidencialidad. Es por esto por lo que se cuestiona si la propagación de la totalidad de los hallazgos encontrados mediante NGS conllevaría un beneficio o un riesgo para el recién nacido y su familia. Si bien es cierto que algunos de los hallazgos secundarios pueden tener una importancia sustancial en el niño, al poder beneficiarse de un tratamiento a tiempo-en el caso de enfermedades de aparición en la edad adulta prevenibles- o en la familia, en cuanto a planificación reproductiva futura; no están

relacionados con el objetivo principal de las pruebas de detección. Por otro lado, la detección de variantes relacionadas con el estado de portador (28,29) en un recién nacido podría aumentar el estrés familiar e, incluso, la autoinculpación de los padres; sin demostrar utilidad clínica, al menos en el momento de la identificación del hallazgo. Algunos grupos de expertos sugieren que no se deben informar las variantes patogénicas que no impliquen una intervención en el niño en el momento de la detección o de manera inminente, debido al impacto que puede generar en la dinámica familiar. Otros, sin embargo, recomiendan ofrecer los hallazgos secundarios y las variantes relacionadas con el estado de portador (38,39) en función de la utilidad para el recién nacido, así como de la fortaleza científica del hallazgo identificado (23). Debido a todo esto, sería necesaria la creación de un consentimiento informado más robusto y un asesoramiento genético tanto pre-prueba como post-prueba; considerando, además, la educación genética de los padres y madres, de los profesionales de la salud y de la sociedad en general (26).

Hay estudios que muestran que la actitud de los padres respecto a los hallazgos secundarios, a pesar de los potenciales riesgos mencionados, es a favor de recibir información acerca del mayor número de enfermedades, sean cuales sean sus condiciones de debut y tratamiento, entre otras (40). Dentro del Proyecto BabySeq se estudió cómo los padres y los profesionales de la salud percibían los beneficios y los riesgos del cribado neonatal, coincidiendo ambos en una superioridad para el cribado metabólico actual sobre el cribado genómico. Esto se debe, principalmente, a que el NBS metabólico está destinado a la detección de un grupo de enfermedades para las que existe un tratamiento eficaz, sin encontrarse en él hallazgos secundarios; siendo la detección de estos uno de los mayores desafíos de la NGS. Además, la sensibilidad del NBS convencional supera los resultados mostrados por las diferentes técnicas de secuenciación. Con todo, el NBS convencional ha sido y es un programa que cuenta con el apoyo de los padres y madres (cuyo consentimiento es más bien implícito), ofreciendo unos beneficios clínicos demostrables; y que podría verse alterado con la introducción de las técnicas de secuenciación masiva, al percibir que los padres y madres estarían más involucrados en la toma de decisiones, desafiando los potenciales beneficios y añadiendo más riesgos, psicológicos y éticos, sobre todo. No obstante, los padres mostraron un punto de vista más favorable que los médicos en cuanto a la relación beneficio/riesgo del NBS genético (41). Tanto los padres como los sanitarios concordaron en que el diagnóstico temprano y la detección del riesgo de enfermedad, con la consiguiente intervención precoz; son los principales beneficios del cribado neonatal, tanto metabólico como genético. En cuanto a los riesgos, aunque tanto los progenitores como los profesionales de la salud detectaron el estrés psicológico o la potencial discriminación de los niños por su diagnóstico como riesgos sustanciales asociados a la NGS; los médicos también evaluaron la incertidumbre asociada a los hallazgos incidentales o a los resultados no deseados, que podría aumentar la angustia familiar. Por otro lado, los padres comentaron beneficios no previstos por los médicos; como la utilidad de la información genética en la planificación familiar, o razones psicológicas y prácticas (42,43)-como el conocimiento de la enfermedad en sí mismo-; pero que, al no conducir a un cambio en el manejo clínico, se quedan fuera de los objetivos tradicionales del cribado (44).

Atendiendo a los aspectos técnicos, los estudios dirigidos por Ceyhan-Birsoy et al., Roman et al. y Boemer et al., que emplearon WES como técnica de secuenciación; han expuesto, sobre todo, las limitaciones que presenta este método en el contexto del cribado neonatal. Por un lado, la cobertura de la secuencia analizada por WES no es uniforme (30) por el proceso de enriquecimiento previo necesario (9) y, debido al tamaño de las regiones secuenciadas, no es posible detectar algunas variantes estructurales, como ciertos CNVs (30) ni repeticiones de nucleótidos, siendo muy difícil también detectar algunos tipos de inserciones y deleciones (23). Además, no alcanza la sensibilidad del NBS convencional, necesaria en una prueba de cribado. Sin embargo, el análisis genómico con WES sí que podría aumentar la especificidad de la prueba, distinguiendo los fenotipos graves de los leves, cuando exista una correlación genotipo-fenotipo para la patología diagnosticada, y clasificando, por tanto, qué sujetos se beneficiarían más de una intervención (29).

Las limitaciones mencionadas también se muestran en el estudio llevado a cabo por Bodian et al., que empleó WGS como técnica de secuenciación. Este método redujo los falsos positivos, resolvió los resultados no concluyentes generados por la NBS convencional, e identificó a bebés con trastornos que no podrían distinguirse por NBS rutinaria, como los fenotipos leves de ciertas enfermedades que no se beneficiarían de una intervención, y que con el NBS tradicional serían tratados de manera innecesaria, llevando en muchos casos a la iatrogenia. No obstante, la WGS mostró un mayor número de resultados inciertos, debido al aluvión de información que genera, muchos de los cuales son inútiles y no muestran relevancia médica, conllevando una sobrecarga en el circuito asistencial y requiriendo el desarrollo de protocolos de seguimiento adecuados; siendo esta su principal limitación. Además, no fue capaz de identificar algunas condiciones cuya etiología no está muy clara o no son de origen genético, como el HC. Por otro lado, e igual que el WES, mostró una sensibilidad menor respecto al NBS convencional.

Por último, los estudios que utilizaron un panel de genes como método de secuenciación, dirigidos por Park KJ et al., Peng Q et al. y Wang et al., han demostrado que el empleo de estos paneles resulta mucho más fácil en cuanto a uso y, además, muestran una mayor rentabilidad que las pruebas no dirigidas, siendo del 100% en los dos primeros. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Wang et al. la sensibilidad de la prueba descendió hasta un 55,6%. Por otro lado, el coste de este tipo de pruebas es inferior al WES o WGS y, tanto el estudio de Park KJ et al. como el dirigido por Wang et al., han demostrado una disminución del TAT en comparación con la confirmación mediante una técnica ortogonal, como es el método de Sanger. En conclusión, este tipo de técnica resulta llamativa y podría ser de utilidad en un entorno de detección de neonatos asintomáticos, al reducir la tasa de falsos positivos, disminuir el coste y detectar la mayoría de EMH (32); pero es necesario perfeccionar el diseño, agregando más variantes genéticas con implicación clínica para así aumentar la sensibilidad, condición necesaria en una prueba de cribado.

Las características técnicas expuestas, en cuanto a resultados, demuestran que un enfoque a través de paneles de genes que identifiquen variantes patogénicas con funciones conocidas y relacionadas con enfermedades tratables y con debut en edad pediátrica, puede resultar una alternativa útil a WES o WGS; mostrando tasas de diagnóstico y detección comparables, y generando muchos menos hallazgos incidentales.

Los estudios incluidos en esta revisión sugieren que no sería aconsejable confiar la detección de errores congénitos del metabolismo exclusivamente a las técnicas de secuenciación en un ámbito de cribado neonatal, debido a las limitaciones que presentan las diferentes técnicas empleadas, así como el desafío en la interpretación de variantes (45). En todos ellos consideran que, por los motivos expuestos anteriormente, la NGS es un buen método complementario al NBS convencional, mostrando su mayor rendimiento en un enfoque de detección de condiciones raras que carezcan de biomarcadores específicos; orientado en un primer momento como una combinación de metabolómica y genómica (30).

La principal limitación de los estudios incluidos en la revisión fue el tamaño de las muestras de cada uno de ellos, ya que analizaron poblaciones muy pequeñas. Además, los métodos de secuenciación empleados en los estudios mostraron las limitaciones técnicas mencionadas previamente. Como añadido, sobre todo en los estudios dirigidos por Ceyhan-Birsoy et al. (28) y Roman et al. (29), la aleatorización de los participantes para recibir o no NGS pudo haber desalentado a algunos padres cuyos hijos podrían beneficiarse de un diagnóstico basado en NGS como parte de otro estudio no aleatorio o como parte de su atención convencional; creando así una autoselección de sujetos con fenotipos menos idóneos para beneficiarse de esta técnica, sobre todo en las cohortes de UCIN. Además, el único en el que se describe que las cohortes estaban cegadas, en un primer momento, al analista molecular fue el estudio NC NEXUS; siendo, por tanto, el único que ha podido reproducir de una manera más fiable los resultados simulando un entorno de detección real.

CONCLUSIONES

1. La secuenciación genómica de nueva generación no debería reemplazar, en la actualidad, al cribado metabólico neonatal clásico basado en marcadores bioquímicos; debido a la heterogeneidad etiológica de las enfermedades genéticas, a los conocimientos actuales y a los desafíos existentes en cuanto a la interpretación de variantes. Además, hay que tener en cuenta las consideraciones éticas de su implementación, que limitan su aplicación en un entorno de detección de población asintomática y vulnerable.

2. Las tecnologías de NGS requieren nuevas estrategias comunicativas y de educación a los padres, los profesionales y la sociedad; por la gran cantidad de información que generan.

3. La NGS puede ser muy útil como prueba de segundo nivel, aumentando la especificidad de la MS/MS y ayudando a diferenciar los falsos positivos de los verdaderamente positivos; así como a distinguir los fenotipos leves de los graves.

4. La NGS, además, podría resultar de interés como prueba de detección de enfermedades raras que no son detectadas mediante el NBS actual por la inexistencia de metabolitos disponibles para su cribado.

5. Hay muy poca información sobre el valor predictivo positivo y negativo de estas pruebas genéticas en un entorno de detección, destinado a recién nacidos asintomáticos cuyo riesgo de presentar una enfermedad genética, a priori, es muy bajo.

6. El rendimiento de NGS, sea cual sea la técnica empleada, seguirá en aumento a medida que mejoren las plataformas empleadas y cada vez se está aumentando más la cobertura de las secuencias empleadas, lo que lo acercará de una manera más plausible a su uso en un entorno de detección.

7. Han de desarrollarse, por tanto, estudios futuros con cohortes más grandes con el fin de estudiar e investigar más detenidamente los factores éticos y psicosociales asociados a la implementación de NGS en un entorno de cribado neonatal, así como evaluar el seguimiento de los pacientes positivos de los estudios actuales para demostrar la utilidad clínica y los efectos a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.Santos Simarro F. Advances in clinical genetics and its current challenges. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2022;97(4): 281.e1-281.e5. [Pubmed]
- 2.Abou Tayoun AN, Krock B, Spinner NB. Sequencing-based diagnostics for pediatric genetic diseases: progress and potential. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(9):987-99. [Pubmed]
- 3.Wojcik MH, Stadelmaier R, Heinke D, Holm IA, Tan WH, Agrawal PB. The Unrecognized Mortality Burden of Genetic Disorders in Infancy. *Am J Public Health*. 2021;111(S2): S156-S162. [Pubmed]
- 4.Wojcik MH, Schwartz TS, Yamin I, Edward HL, Genetti CA, Towne MC, Agrawal PB. Genetic disorders and mortality in infancy and early childhood: Delayed diagnoses and missed opportunities. *Genet Med*. 2018;20(11):1396-1404. [Pubmed]
5. Lay-Son RG, León PL. Perspectivas actuales sobre el diagnóstico genómico en pediatría [Current perspectives on genome-based diagnostic tests in Pediatrics]. *Rev Chil Pediatr*. 2015;86(1):3-11. Spanish. [Pubmed]
- 6.Saudi Mendeliome Group. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol*. 2015; 16(1):134. [Pubmed]
7. Sun Y, Ruivenkamp CA, Hoffer MJ, Vrijenhoek T, Kriek M, van Asperen CJ, den Dunnen JT, Santen GW. Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? *Hum Mutat*. 2015;36(6):648-55. [Pubmed]
- 8.Prieto C. Genética en pediatría. 3ª mesa redonda. *Rev Canar Pediatr* [Internet]. 2022;46(2): 178-188. Disponible en: <https://sctfe.com/wp-content/uploads/2022/07/46-2-Genetica-en-pediatria.pdf>
9. Morán E. Ventajas e inconvenientes del uso de WES y WGS en el diagnóstico genético. *Life science lab*. [Internet] 2020; 102,103. Disponible en: <https://lifescienceslab.com/descargar.php?seccion=articulos&archivo=HRkzI4UD4Pi7Grw0Y1CfoNR9QyHzLnvT5VHCNcGGroBxVyvunyOQBfO.pdf>
10. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, King DA, Ambridge K, Barrett DM, Bayzatinova T, Bevan AP, Bragin E, Chatzimichali EA, Gribble S, Jones P, Krishnappa N, Mason LE, Miller R, Morley KI, Parthiban V, Prigmore E, Rajan D, Sifrim A, Swaminathan GJ, Tivey AR, Middleton A, Parker M, Carter NP, Barrett JC, Hurler ME, FitzPatrick DR, Firth HV; DDD study. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet*. 2015;385(9975):1305-14. [Pubmed]
11. Scarpa M, Bonham JR, Dionisi-Vici C, Prevot J, Pergent M, Meyts I, Mahlaoui N, Schielen PCJ. Newborn screening as a fully integrated system to stimulate equity in neonatal screening in Europe. *Lancet Reg Health Eur*. 2022;13: 100311. [Pubmed]

12. Berg JS, Agrawal PB, Bailey DB Jr, Beggs AH, Brenner SE, Brower AM, Cakici JA, Ceyhan-Birsoy O, Chan K, Chen F, Currier RJ, Dukhovny D, Green RC, Harris-Wai J, Holm IA, Iglesias B, Joseph G, Kingsmore SF, Koenig BA, Kwok PY, Lantos J, Leeder SJ, Lewis MA, McGuire AL, Milko LV, Mooney SD, Parad RB, Pereira S, Petrikin J, Powell BC, Powell CM, Puck JM, Rehm HL, Risch N, Roche M, Shieh JT, Veeraraghavan N, Watson MS, Willig L, Yu TW, Urv T, Wise AL. Newborn Sequencing in Genomic Medicine and Public Health. *Pediatrics*. 2017;139(2): e20162252. [Pubmed]
13. Kingsmore SF, Smith LD, Kunard CM, Bainbridge M, Batalov S, Benson W, Blincow E, Caylor S, Chambers C, Del Angel G, Dimmock DP, Ding Y, Ellsworth K, Feigenbaum A, Frise E, Green RC, Guidugli L, Hall KP, Hansen C, Hobbs CA, Kahn SD, Kiel M, Van Der Kraan L, Krilow C, Kwon YH, Madhavrao L, Le J, Lefebvre S, Mardach R, Mowrey WR, Oh D, Owen MJ, Powley G, Scharer G, Shelnut S, Tokita M, Mehtalia SS, Oriol A, Papadopoulos S, Perry J, Rosales E, Sanford E, Schwartz S, Tran D, Reese MG, Wright M, Veeraraghavan N, Wigby K, Willis MJ, Wolen AR, Defay T. A genome sequencing system for universal newborn screening, diagnosis, and precision medicine for severe genetic diseases. *Am J Hum Genet*. 2022;109(9):1605-1619. [Pubmed]
14. Exe N, Ferguson H, Krokosky A, Sawyer S, Terry S. Genetic Testing Stories. Washington (DC): Genetic Alliance; 2006. [Pubmed]
15. Tabla 1: Harris R, Sawaya GF, Moyer VA, Calonge N. Reconsidering the criteria for evaluating proposed screening programs: reflections from 4 current and former members of the U.S. Preventive services task force. [Internet] *Epidemiol Rev*. 2011; 33:20-35. Disponible en: <https://academic.oup.com/epirev/article/33/1/20/491396?login=false>
16. Tabla 2: Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children-Recommended Uniform Screening Panel [consultado el 17 marzo 2023] [Internet]. Disponible en: <https://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/recommendpanel/index.html>
17. Welling L, Boelen A, Derks TG, Schielen PC, de Vries M, Williams M, Wijburg FA, Bosch AM. Nine years of newborn screening for classical galactosemia in the Netherlands: Effectiveness of screening methods, and identification of patients with previously unreported phenotypes. *Mol. Genet. Metab*. 2017; 120, 223–228. [Pubmed]
18. Yang H, Rossignol F, Cyr D, Laframboise R, Wang S P, Soucy J.-F, Berthier M-T, Giguère Y, Waters PJ, Mitchell G.A, the Québec NTBC Study Group. Mildly elevated succinylacetone and normal liver function in compound heterozygotes with pathogenic and pseudodeficient FAH alleles. *Mol. Genet. Metab. Rep*. 2018; 14, 55–58. [Pubmed]
19. Veldman A, Kiewiet MBG, Heiner-Fokkema MR, Nelen MR, Sinke RJ, Sikkema-Raddatz B, Voorhoeve E, Westra D, Dollé MET, Schielen PCJI, van Spronsen FJ. Towards Next-Generation Sequencing (NGS)-Based Newborn Screening: A Technical Study to Prepare for the Challenges Ahead. *Int J Neonatal Screen*. 2022;8(1):17. [Pubmed]
20. Waisbren SE, Levy HL, Noble M, Matern D, Gregersen N, Pasley K, Marsden D. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical

and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms. *Mol Genet Metab.* 2008;95(1-2):39-45. [Pubmed]

21. Sadat R, Hall PL, Wittenauer AL, Vengoechea ED, Park K, Hagar AF, Singh R, Moore RH, Gambello MJ. Increased parental anxiety and a benign clinical course: Infants identified with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency through newborn screening in Georgia. *Mol Genet Metab.* 2020;129(1):20-25. [Pubmed]

22. Meade C, Bonhomme NF. Newborn screening: adapting to advancements in whole-genome sequencing. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18(9):597-8. [Pubmed]

23. Pàmpol Ros T, Pérez Aytés A, García Sagredo JM, Díaz de Bustamante A, Blanco Guillermo I. Cribado neonatal genómico. Perspectiva de la Comisión de ética de la Asociación Española de Genética Humana. Parte I. Las tecnologías de secuenciación masiva (NGS) y su aplicación al cribado neonatal. Desafíos y oportunidades [Genomic newborn screening. Perspective from the Ethics commission of the Spanish Society for Human Genetics. Part I. Next generation sequencing technologies applied to newborn screening. Challenges and opportunities.]. *Rev Esp Salud Publica.* 2022;96: e202202012. Spanish. [Pubmed]

24. Holm IA, Agrawal PB, Ceyhan-Birsoy O, Christensen KD, Fayer S, Frankel LA, Genetti CA, Krier JB, LaMay RC, Levy HL, McGuire AL, Parad RB, Park PJ, Pereira S, Rehm HL, Schwartz TS, Waisbren SE, Yu TW; BabySeq Project Team; Green RC, Beggs AH. The BabySeq project: implementing genomic sequencing in newborns. *BMC Pediatr.* 2018;18(1):225. [Pubmed]

25. Knoppers BM, Sénécal K, Borry P, Avard D. Whole-genome sequencing in newborn screening programs. *Sci Transl Med.* 2014; 6 (229): 229cm2. [Pubmed]

26. Pàmpol Ros T, Pérez Aytés A, García Sagredo JM, Díaz de Bustamante A, Blanco Guillermo I. Cribado neonatal genómico. Perspectiva de la Comisión de ética de la Asociación Española de Genética Humana. Parte II: Aspectos Éticos, Legales y Sociales (AELS) de la Introducción de las Tecnologías de Secuenciación Masiva (NGS) en un programa de cribado neonatal de Salud Pública [Genomic newborn screening. Perspective from the Ethics Commission of the Spanish Society for Human Genetics. Part II: Ethical, legal and social issues (ELSI) of the introduction of next generation sequencing technologies in a public health newborn screening program.]. *Rev Esp Salud Publica.* 2022;96: e202203030. Spanish. [Pubmed]

27. Friedman JM, Bombard Y, Cornel MC, Fernandez CV, Junker AK, Plon SE, Stark Z, Knoppers BM; Paediatric Task Team of the Global Alliance for Genomics and Health Regulatory and Ethics Work Stream. Genome-wide sequencing in acutely ill infants: genomic medicine's critical application? *Genet Med.* 2019;21(2):498-504. [Pubmed]

28. Ceyhan-Birsoy O, Murry JB, Machini K, Lebo MS, Yu TW, Fayer S, Genetti CA, Schwartz TS, Agrawal PB, Parad RB, Holm IA, McGuire AL, Green RC, Rehm HL, Beggs AH; BabySeq Project Team. Interpretation of Genomic Sequencing Results in Healthy and Ill Newborns: Results from the BabySeq Project. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):76-93. [Pubmed]

29. Roman TS, Crowley SB, Roche MI, Foreman AKM, O'Daniel JM, Seifert BA, Lee K, Brandt A, Gustafson C, DeCristo DM, Strande NT, Ramkissoo L, Milko LV, Owen P, Roy S, Xiong M, Paquin RS, Butterfield RM, Lewis MA, Souris KJ, Bailey DB Jr, Rini C, Booker JK, Powell BC, Weck KE, Powell CM, Berg JS. Genomic Sequencing for Newborn Screening: Results of the NC NEXUS Project. *Am J Hum Genet.* 2020;107(4):596-611. [Pubmed]
30. Boemer F, Fasquelle C, d'Otreppe S, Josse C, Dideberg V, Segers K, Guissard V, Capraro V, Debray FG, Bours V. A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects causal mutations in patients with inherited metabolic diseases. *Sci Rep.* 2017;7(1):17641. [Pubmed]
31. Bodian DL, Klein E, Iyer RK, Wong WS, Kothiyal P, Stauffer D, Huddleston KC, Gaither AD, Remsburg I, Khromykh A, Baker RL, Maxwell GL, Vockley JG, Niederhuber JE, Solomon BD. Utility of whole-genome sequencing for detection of newborn screening disorders in a population cohort of 1,696 neonates. *Genet Med.* 2016;18(3):221-30. [Pubmed]
32. Wang H, Yang Y, Zhou L, Wang Y, Long W, Yu B. NeoSeq: a new method of genomic sequencing for newborn screening. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16(1):481. [Pubmed]
33. Park KJ, Park S, Lee E, Park JH, Park JH, Park HD, Lee SY, Kim JW. A Population-Based Genomic Study of Inherited Metabolic Diseases Detected Through Newborn Screening. *Ann Lab Med.* 2016;36(6):561-72. [Pubmed]
34. Peng Q, Liu G, Zhu P, Wu C, He X, Li W, Rao C, Li S, Lu X. A targeted gene capture next-generation sequencing panel for genetic screening of newborns. *J Pak Med Assoc.* 2020;70(10):1789-1794. [Pubmed]
35. Kingsmore SF; BeginNGS Consortium. Dispatches from Biotech beginning BeginNGS: Rapid newborn genome sequencing to end the diagnostic and therapeutic odyssey. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2022;190(2):243-256. [Pubmed]
36. De Castro MJ. NeoSeq: una herramienta de diagnóstico genético rápido para recién nacidos críticamente enfermos con sospecha de enfermedad genética [dissertation]. Universidad de Santiago de Compostela, Escola de Doutoramento Internacional (EDIUS); 2021. 231p.
37. Reinstein E. Challenges of using next generation sequencing in newborn screening. *Genet Res (Camb).* 2015;97: e21. [Pubmed]
38. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, McGuire AL, Nussbaum RL, O'Daniel JM, Ormond KE, Rehm HL, Watson MS, Williams MS, Biesecker LG; American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med.* 2013 Jul;15(7):565-74. [Pubmed]
39. Bick D, Fraser PC, Gutzeit MF, Harris JM, Hambuch TM, Helbling DC, Jacob HJ, Kersten JN, Leuthner SR, May T, North PE, Prisco SZ, Schuler BA, Shimoyama M,

Strong KA, Van Why SK, Veith R, Verbsky J, Weborg AM Jr, Wilk BM, Willoughby RE Jr, Worthey EA, Dimmock DP. Successful Application of Whole Genome Sequencing in a Medical Genetics Clinic. *J Pediatr Genet.* 2017;6(2):61-76. [Pubmed]

40. Fernandez CV, Bouffet E, Malkin D, Jabado N, O'Connell C, Avard D, Knoppers BM, Ferguson M, Boycott KM, Sorensen PH, Orr AC, Robitaille JM, McMaster CR. Attitudes of parents toward the return of targeted and incidental genomic research findings in children. *Genet Med.* 2014;16(8):633-40. [Pubmed]

41. Pereira S, Robinson JO, Gutierrez AM, Petersen DK, Hsu RL, Lee CH, Schwartz TS, Holm IA, Beggs AH, Green RC, McGuire AL; BabySeq Project Group. Perceived Benefits, Risks, and Utility of Newborn Genomic Sequencing in the BabySeq Project. *Pediatrics.* 2019;143(Suppl 1): S6-S13. [Pubmed]

42. Malek J, Slashinski MJ, Robinson JO, Gutierrez AM, Parsons DW, Plon SE, McCullough LB, McGuire AL. Parental Perspectives on Whole Exome Sequencing in Pediatric Cancer: A Typology of Perceived Utility. *JCO Precis Oncol.* 2017;1: 1-10. [Pubmed]

43. Reiff M, Giarelli E, Bernhardt BA, Easley E, Spinner NB, Sankar PL, Mulchandani S. Parents' perceptions of the usefulness of chromosomal microarray analysis for children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2015;45(10):3262-75. [Pubmed]

44. Grosse SD, Khoury MJ. What is the clinical utility of genetic testing? *Genet Med.* 2006;8(7):448-50. [Pubmed]

45. Wojcik MH, Zhang T, Ceyhan-Birsoy O, Genetti CA, Lebo MS, Yu TW, Parad RB, Holm IA, Rehm HL, Beggs AH, Green RC, Agrawal PB; BabySeq Project Team. Discordant results between conventional newborn screening and genomic sequencing in the BabySeq Project. *Genet Med.* 2021;23(7):1372-1375. [Pubmed]