

Programa de posgrado en Genética

Tesis de Maestría:

**IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA
GENERACIÓN Y LA HIBRIDACIÓN GENOMICA COMPARATIVA – ARRAY EN
EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE PACIENTES QUE ACUDEN A CONSULTA
MÉDICA DE GENÉTICA.**

Pablo Andrés Robayo Gómez

Barranquilla (Atlántico), Colombia

2020

Universidad Simón Bolívar
Programa de posgrado en Genética

**IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA
GENERACIÓN Y LA HIBRIDACIÓN GENOMICA COMPARATIVA – ARRAY EN
EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE PACIENTES QUE ACUDEN A CONSULTA
MÉDICA DE GENÉTICA.**

Tesis presentada al Programa de
Postgrado en Genética como
requisito parcial para obtener
el grado de Magister.

Pablo Andrés Robayo Gómez

Tutor: MSc. Henry Ostos Alfonso

Cotutor: PhD. Cristiano Trindade

Barranquilla (Atlántico), Colombia

2020



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

ACREDITADA DE
ALTA CALIDAD

Resolución 11233 / 2018 - MEN

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, en el departamento del Huila, gracias al convenio interinstitucional entre la Universidad SIMÓN BOLÍVAR y la Universidad SURCOLOMBIANA, firmado el 29 de octubre del año 2012. El cual establece canales de comunicación y cooperación que generan un vínculo que tiene como finalidad la integración y el desarrollo de objetivos comunes como la educación, la investigación científica y la promoción del desarrollo social de sus respectivas regiones.

DEDICATORIA

“A MI FAMILIA, QUIENES ME ACOMPAÑAN Y ME APOYAN EN CADA PASO DE MI CARRERA Y SON MI MOTIVO DE LUCHA PARA SUPERARME CADA DÍA”

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO AL DOCTOR HENRY OSTOS POR SU DISPOSICIÓN Y COMPROMISO CON LA DOCENCIA, A FRANK BARREIRO Y AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE INMUNOGENÉTICA, POR BRINDARME SU APOYO Y ABRIRME SUS PUERTAS, ASÍ COMO A LA DRA. SANDRA BERMEO Y A TODA LA PLANTA DOCENTE DE LA UNIVERSIDAD SIMÓN BOLIVAR, POR SUS ENSEÑANZAS DURANTE ESTE PROCESO.

RESUMEN

Las técnicas de Secuenciación de nueva generación (NGS) y la hibridación genómica comparativa con *microarrays* (a-CGH) permiten el estudio de las anomalías cromosómicas. Su utilidad en la aproximación diagnóstica de los pacientes con retraso global del desarrollo, alteraciones dismorfológicas, alteraciones en talla, peso y neoplasias es importante. Sin embargo, no han sido estudiadas en poblaciones colombianas en centros de salud periféricos. Por lo anterior, se realizó un estudio observacional descriptivo y retrospectivo transversal de serie de casos, con 208 pacientes que asistieron a la consulta médica de genética del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva (Huila), el cual tuvo como objetivo principal evaluar el rendimiento diagnóstico de las NGS y la aCGH; el uso de estas técnicas permitió la identificación de patologías que no fueron detectadas mediante ejercicio clínico, u otro tipo de exámenes de apoyo, incluyendo técnicas de citogenética clásica, arrojando en conjunto un rendimiento diagnóstico del 44% en la población estudiada. De esta manera, se evidencio que estos exámenes moleculares son efectivos en la aproximación diagnóstica etiológica de pacientes con enfermedades de base genética y deben ser utilizados como técnicas de primera línea en los casos indicados.

PALABRAS CLAVE: Exoma, microarrays, retraso global del desarrollo, cromosomopatías.

ABSTRACT

New generation sequencing techniques (NGS) and comparative genomic hybridization with microarrays (a-CGH) allow the study of chromosomal abnormalities. Its utility in the diagnostic approach of patients with global developmental delay, dysmorphological alterations, alterations in height, weight, and malignancies is important. However, we have not been studied in Colombian populations in peripheral health centers. Therefore, an observational descriptive and retrospective cross-sectional study of case series was carried out with 208 patients who attended the genetic consultation at the Hernando Moncaleano Perdomo University Hospital in the city of Neiva (Huila), whose main objective was to evaluate the diagnostic performance of the NGS and the a-CGH; The use of these techniques allowed the identification of pathologies that were not detected through clinical exercise, or other types of support exams, including classical cytogenetic techniques, together yielding a diagnostic yield of 44% in the study population. In this way, it is evident that these molecular exams are effective in the etiological diagnostic approach of patients with genetically based diseases and should be used as first-line techniques in the indicated cases.

KEYWORDS: Exome, Microarrays, Global developmental delay, Chromosomal disorders

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 OBJETIVO GENERAL	5
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
5. MARCO TEORICO	6
5.1 GENERALIDADES.....	6
5.2 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA CON MICROARRAYS.....	8
5.3 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.....	12
5.3.1 PANEL MOLECULAR.....	18
5.3.2 EXOMA.....	19
5.3.3 EXOMA CLINICO	20
5.3.4 SECUENCIACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL.....	20
5.3.5 SECUENCIACIÓN DE ÚNICO GEN	21
5.3.6 SECUENCIACIÓN DEL GENOMA	21
5.3.7 INTERPRETACIÓN DE EXÁMENES MOLECULARES	22
5.4 AMPLIFICACIÓN DE SONDA DEPENDIENTE DE LIGADURA MULTIPLEX	23
6. METODOLOGÍA	25
6.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	25
6.2 ÁREA DE ESTUDIO.....	25
6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	25
6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	26
6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	26
6.6 PROCEDIMIENTOS PARA RECOLECCIÓN Y ANALISIS DE DATOS	27
6.7 ASPECTOS ÉTICOS	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
7.1 RESULTADOS.....	28
7.2 DISCUSION	35

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
8.1 CONCLUSIONES.....	39
8.2 RECOMENDACIONES	40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42
10. ANEXOS.....	45
10.1 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	45
10.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO	45
10.3 ACTA DE APROBACIÓN DE COMITÉ DE ÉTICA	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias de las principales plataformas de NGS de segunda generación.....	17
Tabla 2. Diferencias de las principales plataformas de NGS de tercera generación.	18
Tabla 3. Hallazgo clínico principal y/o motivo de consulta.	32
Tabla 4. Hallazgos patogénicos en pacientes con examen previo de cariotipo	33
Tabla 5. Rendimiento diagnóstico individual y total de las pruebas moleculares.....	33
Tabla 6. Frecuencia del tipo de cambio patogénico.....	34
Tabla 7. Regiones genómicas afectadas en más de un paciente.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema global de la Técnica aCGH.....	11
Figura 2. Lectura bioinformática de una aCGH.....	12
Figura 3. Esquema de secuenciación Sanger manual vs Automatizado	14
Figura 4. Paralelo entre NGS de 2da y 3ra generación	16
Figura 5. Flujo de trabajo para realizar la Técnica NGS.....	16
Figura 6. Porcentaje de nacimientos de los pacientes por Departamentos.....	31

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades genéticas corresponden a una repercusión nociva, producida por cualquier tipo de alteración en algún punto del genoma humano, teniendo como resultado, la síntesis de proteínas defectuosas que no cumplirán sus funciones biológicas adecuadamente, produciendo un fenotipo y una sintomatología característica dependiendo del sistema u órgano afectado, existen alrededor de 6000 enfermedades genéticas, las cuales provocan retraso global del desarrollo o discapacidad intelectual en aproximadamente 1-3% de la población general, trastornos del espectro autista en 0,7% y malformaciones congénitas en 2-3% de individuos, estos datos implican que de 3 a 6.7 de cada 100 niños que nacen, tienen una de estas anomalías. Desde hace varias décadas la técnica más utilizada para el estudio de éste tipo de enfermedades, es el cariotipo, éste examen puede detectar anomalías cromosómicas numéricas y/o estructurales, en un 3-5% de estos pacientes (1).

Con el fin de incrementar este rendimiento diagnóstico, se han logrado técnicas con mejor resolución como la hibridación in situ fluorescente (FISH) y amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación (MLPA), las cuales han permitido incrementar la tasa diagnóstica entre 2,4-5,8% respectivamente, aclarando así el diagnóstico en un gran porcentaje de individuos con un resultado previo de cariotipo normal. No obstante, continúan bajo incógnita cientos de diagnósticos de pacientes con estas características (2, 3).

La secuenciación de nueva generación (NGS) y la tecnología de hibridación genómica comparativa con *arrays* (aCGH) aparecen como esperanza para estos pacientes que cursan con patologías sin un diagnóstico establecido, ya que aumentan significativamente la resolución en la observación cromosómica y poseen las tasas más altas de rendimiento diagnóstico si las comparamos con técnicas anteriores (4).

Las técnicas de NGS y la a-CGH son utilizadas en la práctica médica en pacientes pediátricos y en adultos con indicaciones específicas, incluyendo pacientes oncológicos. Estas pruebas detectan microdeleciones/microduplicaciones y mutaciones que serían imperceptibles con otro tipo de examen, incluso están siendo utilizadas en diagnóstico prenatal donde reportan una mayor sensibilidad y especificidad que otras pruebas estandarizadas en la detección de anomalías cromosómicas (5).

Dadas las grandes ventajas que poseen estas pruebas, deben ser utilizadas como primera o segunda elección en determinados pacientes, reemplazando o complementando al cariotipo en pacientes con problemas neurológicos, autismo, déficit cognitivo y en recién nacidos con anomalías congénitas de etiología desconocida (5).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia al igual que en el resto del mundo aproximadamente entre 25 a 62 de cada 1000 recién nacidos presentan anomalías congénitas, 53 de cada 1000 nacidos vivos tienen algún componente genético en su patología de base, la cual se manifestará antes de los 25 años de edad, el 30% de mortalidad en edad pediátrica corresponde a enfermedades de causa genética, muchas de estas enfermedades tienen una fisiopatología conocida y son prevenibles (6).

Debido a la heterogeneidad y complejidad de las enfermedades genéticas, el obtener un diagnóstico molecular por técnicas convencionales implica un costo elevado y tarda aproximadamente entre uno y diez años, es importante la disminución de este intervalo de tiempo para mejorar el acceso oportuno de los afectados y familiares a tratamientos médicos y de rehabilitación (7).

Aclarar el diagnóstico etiológico de los pacientes planteó el problema que motiva el desarrollo de este trabajo, ya que la identificación oportuna y correcta de determinada patología se convertirá en el pivote que nos permitirá brindar el mejor manejo médico disponible en la actualidad, incluyendo la asesoría genética necesaria para el paciente afectado y su entorno familiar.

Una variación significativa en el uso de las pruebas moleculares para diagnóstico por parte del personal médico plantea la pregunta problema; debido a esto es necesario la instauración de pautas actualizadas que sean consistentes para todas las especialidades en cuanto al uso correcto de las pruebas genéticas disponibles.

Por lo anterior se evaluará la eficiencia del uso del aCGH y NGS como técnicas de primera línea diagnóstica en varios escenarios clínicos, para dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación.

¿Qué beneficios tiene el uso de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y la Hibridación Genómica comparativa con *arrays* (aCGH) en la aproximación diagnóstica de los pacientes que asisten a consulta médica de genética del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo?

3. JUSTIFICACIÓN

Existen numerosos estudios que muestran cómo el uso de técnicas de secuenciación de nueva generación y citogenética molecular en la práctica clínica han aumentado la detección de alteraciones genéticas, las cuales son causantes de diversas patologías que ocasionan grandes daños a nivel físico, psicológico y económico; no solo al paciente si no a sus cuidadores, familiares y a la comunidad afectando su vida desde el punto de vista social, afectivo y laboral (4).

En países desarrollados el uso de este tipo de ayudas diagnosticas se encuentra afianzado, por lo que son utilizadas de rutina en comparación con países en vía de desarrollo (8). En Colombia, la resolución número 5857 del 26 de diciembre de 2018 que actualiza integralmente el Plan de Beneficios en Salud con cargo a la Unidad de Pago por Capitación (UPC), ordena la inclusión de diversas pruebas para genética, a pesar de esto, existen todavía dudas sobre el uso correcto de estos exámenes, además de las barreras interpuestas por un sistema de salud ineficiente que simplifica este tipo de paraclínicos a exámenes costosos que no brindan mayor beneficio para el paciente y poseen una relación costo beneficio desfavorable en términos económicos.

Este trabajo busca demostrar en un grupo de pacientes, un rendimiento diagnóstico similar al reportado en otras poblaciones estudiadas y así dar argumentos sólidos que sirvan para vencer las limitaciones sociales y económicas de acceso a esta tecnología, además aportar evidencias y experiencias que están encaminadas a la difusión e implementación de estos recursos; los cuales nos permitirán brindar diagnósticos más certeros y rápidos, que esperamos puedan servir como guía al personal médico involucrado en el manejo de pacientes con patologías similares, influyendo positivamente en la prevención, tratamiento y consejería genética.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión sobre la utilidad de la hibridación genómica comparativa – *array* (aCGH) y la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) en pacientes que asisten al servicio de genética médica del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad del Neiva (Huila).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el potencial diagnóstico que posee la técnica de citogenética molecular hibridación genómica comparativa por arrays en pacientes que presentan dismorfología y retraso global del neurodesarrollo.
- Determinar el rendimiento diagnóstico de las técnicas de secuenciación de nueva generación en pacientes que presentan patología con base genética.
- Identificar las características fenotípicas y genotípicas de cualquier tipo de aberración cromosómica, comprender sus mecanismos patogénicos y patrones de herencia.

5. MARCO TEORICO

5.1 GENERALIDADES

La práctica médica fue empírica durante siglos y esto ocasionó un progreso lento en cuanto a conocimiento se refiere, cuando aparece la metodología experimental la medicina se transforma en una disciplina confiable permitiendo a los pacientes grandes beneficios y dejando de lado la iatrogenia ocasionada por los procesos médicos que no se sometían al método experimental (9).

Los avances tecnológicos nos han permitido realizar grandes logros, desde el descubrimiento de fármacos para controlar pandemias y enfermedades infectocontagiosas, pasando por la invención de anestésicos que mejoraron la morbilidad y el pronóstico en procedimientos quirúrgicos, hasta llegar a la culminación del proyecto genoma humano, el cual abrió la puerta de entrada para la incorporación de nuevas técnicas de secuenciación masiva NGS y citogenética molecular aplicadas al diagnóstico de enfermedades genéticas las cuales cambiaron completamente el abordaje de este tipo de patologías, aumentado de manera drástica la tasa diagnóstica de aproximadamente un 15% hasta llegar a un promedio de 50%, dentro de este tipo de tecnología de las cuales hablaremos más adelante; destacan, la hibridación genómica comparativa por *array*, paneles moleculares y exoma clínico, estas pruebas no solo tienen utilidad para el paciente que presenta la enfermedad, si no que extiende su beneficio a los familiares, gracias a la identificación de portadores y en lo que respecta a planificación reproductiva (9).

Como en todo acto médico, el objetivo final del genetista es encontrar la causa de una enfermedad para abordarla de manera correcta, se debe tener en cuenta que el eje primordial para llegar a un diagnóstico etiológico satisfactorio es un adecuado razonamiento clínico de los hallazgos semiológicos propios de cada paciente, lo que

se traducirá en un uso racional y eficaz de las herramientas diagnósticas presentes en la actualidad (10).

Diferentes estudios muestran que el 1% de los recién nacidos a nivel mundial presentan anomalías congénitas, mientras que aproximadamente entre el 5-7% de la población presenta algún tipo de discapacidad intelectual o retraso global del neurodesarrollo sin causa aparente, además; que un gran porcentaje de las denominadas enfermedades raras son patologías que tienen su origen en anomalías genéticas. Teniendo en cuenta estas cifras observamos que existe una alta prevalencia de estos cuadros clínicos, muchos de ellos sin ninguna clase de manejo terapéutico y sin historial de estudios previos, por lo que es imprescindible que el personal médico tratante conozca las estrategias necesarias que lo guiarán a una aproximación al diagnóstico etiológico de estas enfermedades, no es correcto acceder a un recurso costoso como los estudios moleculares; sin antes realizar un ejercicio clínico exhaustivo donde obtengamos una sospecha coherente que nos permita una correlación genotipo – fenotipo patológica adecuada en búsqueda de una mutación específica (10).

En los años cincuenta, la citogenética demostraba con el hallazgo de aneuploidias cromosómicas numéricas como el síndrome de Down y el síndrome de Turner, que un desbalance en la dosis génica de un individuo trae consigo una disfunción severa de su fisiología, es así que si se sospecha de una aberración cromosómica debido a múltiples anomalías congénitas, retardo mental de diversos grados, infertilidad de pareja, genitales ambiguos, pérdidas gestacionales recurrentes, diferentes tipos de leucemias o tumores en un paciente, estamos en la obligación de la realización de un cariotipo, este examen mostrara el número total de cromosomas de un individuo y será útil como herramienta diagnóstica, evidenciando anomalías tanto numéricas como estructurales que tengan un tamaño superior a cinco mega bases (5Mb) (10, 11).

Otra técnica citogenética utilizada habitualmente como complemento al cariotipo es la hibridación fluorescente in situ (FISH) la cual toma elementos y aplicaciones de biología molecular para aumentar su rendimiento, esta técnica usa sondas marcadas con fluorescencia, las cuales obedecen a secuencias de cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (ADN) dirigidas a un segmento génico blanco conocido, siendo complementarias a la secuencia de interés y posteriormente después de la hibridación con la cadena muestra, los resultados son analizados mediante el microscopio de fluorescencia. Algunas de sus aplicaciones más importantes son; la observación de microdeleciones no observables por las técnicas de bandedo realizadas en el cariotipo y el estudio de patologías oncológicas hematológicas (12).

Existen casos en donde a pesar de realizar un enfoque clínico y paraclínico correcto de nuestro caso índice no es posible llegar al fin esperado, esto debido a que por lo general no existe un signo patognomónico que nos indique cierta enfermedad y a que la resolución o capacidad diagnóstica de las pruebas estándar citogenéticas no siempre nos permitirán ver lo que deseamos (13). Es allí cuando debemos recurrir a otro tipo de tecnología más avanzada y novedosa, nos referimos a la hibridación genómica comparativa por medio de *microarrays* (a-CGH) y a la secuenciación masiva de nueva generación (NGS) las cuales han evolucionado en los últimos años de manera exponencial gracias al proyecto genoma humano y que hoy en día están disponibles en muchos laboratorios a nivel mundial, por lo que es nuestra obligación conocerlas y darles el mejor uso posible (14).

5.2 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA CON MICROARRAYS

Las pruebas de citogenética han sido el Gold estándar usado por médicos genetistas durante décadas ya que permite visualizar y analizar todo el contenido cromosómico de un individuo para detectar cualquier tipo de reordenamiento cromosómico. La técnica aCGH por las siglas en inglés de *Comparative Genomic Hybridization con array* desempeña la misma labor, pero aumentando la resolución

con respecto al clásico cariotipo, (13, 15). Esta técnica de citogenética molecular tiene como objetivo comparar de manera rápida y eficaz el ADN del paciente con una muestra control, detectando pérdidas (deleciones), ganancias (duplicaciones) y reordenamientos no equilibrados de una manera simultánea, estas diferencias de dosis génica se denominan variaciones en el número de copias (CNV) por las siglas en inglés de *copy number variations* (13, 15).

Inicialmente la aCGH fue diseñada para el estudio de patologías de origen oncológico como el cáncer de mama, cáncer de vejiga y varios tipos de tumores sólidos, hoy en día las indicaciones de su uso se han extendido bastante, según la mayoría de guías clínicas actuales sería correcto su utilización en pacientes que cursen con discapacidad intelectual de cualquier grado o retraso global del neurodesarrollo, refiriéndonos a la población pediátrica, trastornos del espectro autista y anomalías congénitas múltiples, abarcando incluso el área de la medicina materno fetal y el diagnóstico prenatal de productos con posibles aneuploidias, donde estudios reportan una sensibilidad igual o superior a la del uso del cariotipo concomitantemente con la técnica FISH (13-15).

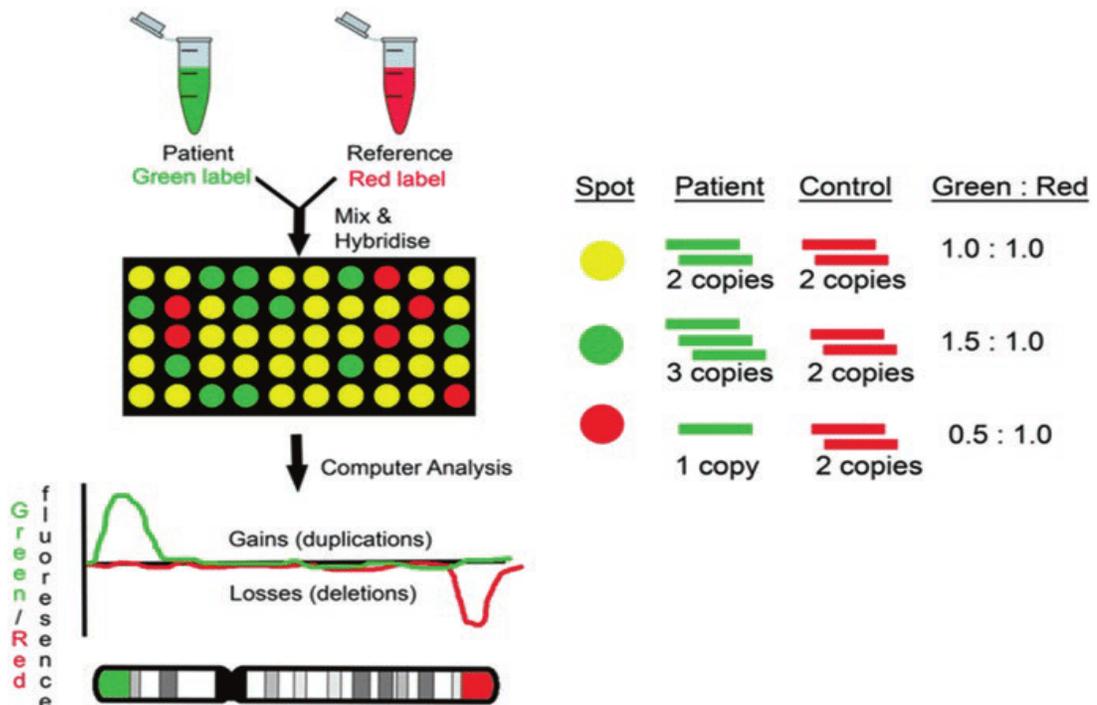
La metodología usada para la realización de esta prueba se basa en técnicas de biología molecular, la cual inicia con la extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre periférica del probando o paciente, el segundo paso consiste en marcar con fluorocromos y en proporciones iguales tanto el ADN extraído de la muestra como el ADN de referencia o control, casi siempre, perteneciente al género femenino debido a la dosis génica superior del cromosoma X frente al cromosoma masculino Y, a continuación, se realiza el proceso de hibridación sobre una placa de microarreglos previamente diseñada con secuencias genómicas definidas de distintos tamaños adheridos a ella mediante un proceso de siliconización y que se derivan de fragmentos genómicos clonados que tienen su origen en cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o plásmidos (figura 1) (16).

El siguiente paso consiste en escanear los datos arrojados posterior a la hibridación, para esto se utilizan avanzados programas bioinformáticos que utilizan sistemas de imágenes digitales y algoritmos de lectura que sirven para cuantificar las cantidades absolutas y relativas de cada uno de los fluoróforos utilizados en el marcaje, la relación entre intensidad, cantidad y solapamiento de los fluorocromos será el mecanismo de medición para evaluar pérdidas o ganancias de material genético. Son usados un fluorocromo de color verde y un fluorocromo de color rojo para el marcaje del ADN muestra y el ADN control respectivamente, y observaremos que posterior a la hibridación obtendremos como resultado tres colores diferentes los cuales corresponderán a rojo en caso de que la muestra presente pérdidas y verde en el caso contrario, que la muestra tenga ganancias de material genético, mientras que si la muestra no presenta ninguna variación en el número de copias presentará una tonalidad amarilla secundaria a la mezcla de colores de las sondas (15). Estos resultados son sometidos a un riguroso control de calidad por medio de análisis en bases de datos mundiales que permitirán un informe final satisfactorio, ético y de utilidad clínica para el médico tratante (figura 2) (14).

La interpretación clínica de la aCGH ha tenido múltiples inconvenientes debido a la robustez de la información suministrada, esta es la razón por la que diferentes asociaciones médicas alrededor del mundo han intentado unificar y consolidar una sola clasificación de resultados, la cual consiste en encasillar la CNV hallada, dentro de una categoría específica, dependiendo su relación o no con un fenotipo patológico (17). Es así que CNV halladas en individuos sanos, las interpretaremos como variantes benignas, una variación asociada a anomalías fenotípicas como CNV patogénica o probablemente patogénica y una variación de la cual no exista suficiente evidencia en la literatura de su asociación directa con fenotipos patológicos o de su presencia en población sana, como CNV de significado clínico incierto (VOUS) por las siglas en inglés de *variants of uncertain significance*, además de estas tres categorías el aCGH nos proporciona hallazgos de regiones de pérdida de heterocigosidad (LOH) del inglés *loss of heterozygosity*, que

dependiendo de su ubicación geográfica dentro del cromosoma podría traducirse en un fenotipo patológico o benigno (17) .

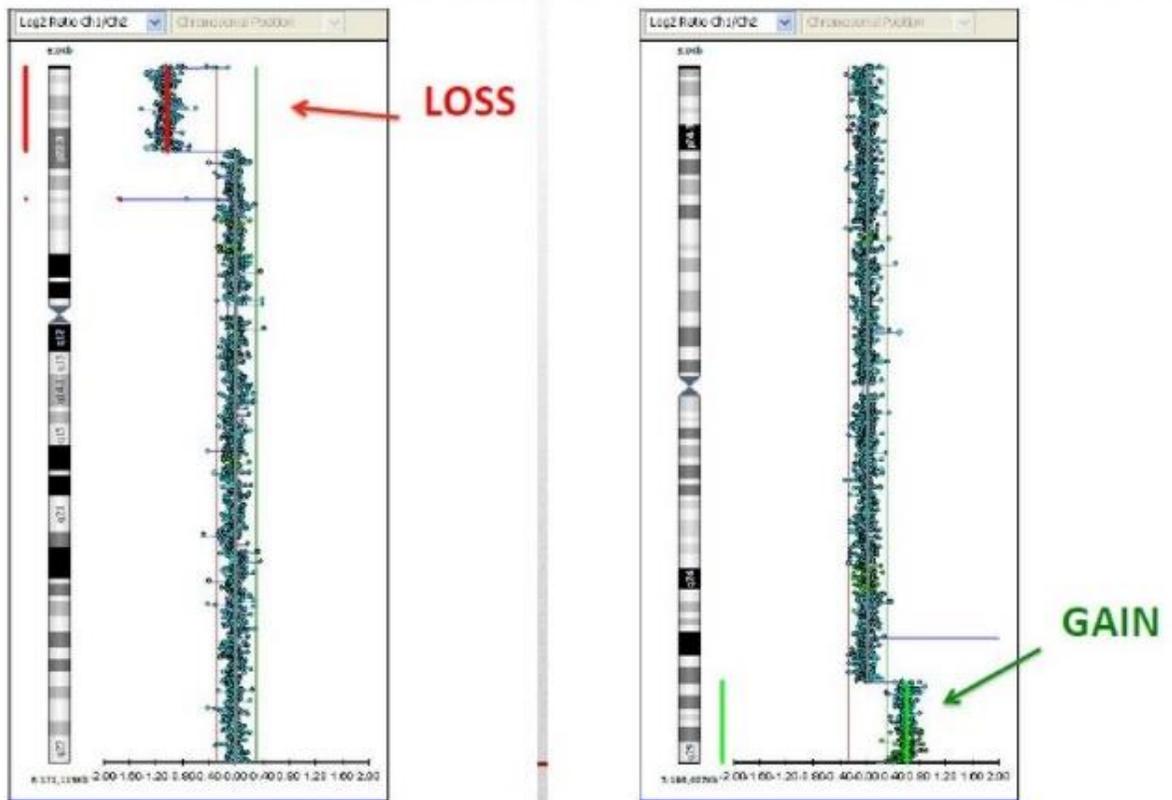
A pesar de sus grandes virtudes frente a pruebas de citogenética clásicas donde destacan el menor tiempo en la obtención de resultados, proceso de realización con técnicas automatizadas no operador dependiente, no necesidad de realización de cultivo celular, detección simultanea de cambios en el número de copias a nivel genómico y hallazgo de reordenamientos cromosómicos no equilibrados, aCGH presenta ciertos inconvenientes o desventajas frente a otras pruebas moleculares como lo es su alto costo, además de la incapacidad para evidenciar translocaciones de tipo balanceadas, así como poliploidías, mutaciones puntuales y deleciones e inserciones en mosaico con un porcentaje inferior a 30-40% aproximadamente dependiendo de la plataforma comercial utilizada (5, 15).



Dugoff, L., Norton, M. E., Kuller, J. A., & Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). (2016). The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 215(4), B2-B9.

Figura 1. Esquema global de la aCGH, muestra la hibridación de la muestra y el control, previamente marcadas con fluorocromos, para posteriormente ser

interpretada a través de la fluorescencia emitida, rojo=deleciones; verde=duplicaciones.



Antoni Borrell, BCNatal-Hospital Clínic Barcelona, Citogenética convencional vs. molecular para el diagnóstico de las anomalías cromosómicas fetales. 2018.

Figura 2. Lectura bioinformática de una aCGH, en cada cuadro se observa el ideograma de un cromosoma y a la derecha dentro del cuadro, señalado por flechas, el esquema digitalizado del mismo cromosoma en la plataforma aCGH, loss=Deleciones(Rojo); Gain=Duplicaciones (Verde).

5.3 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

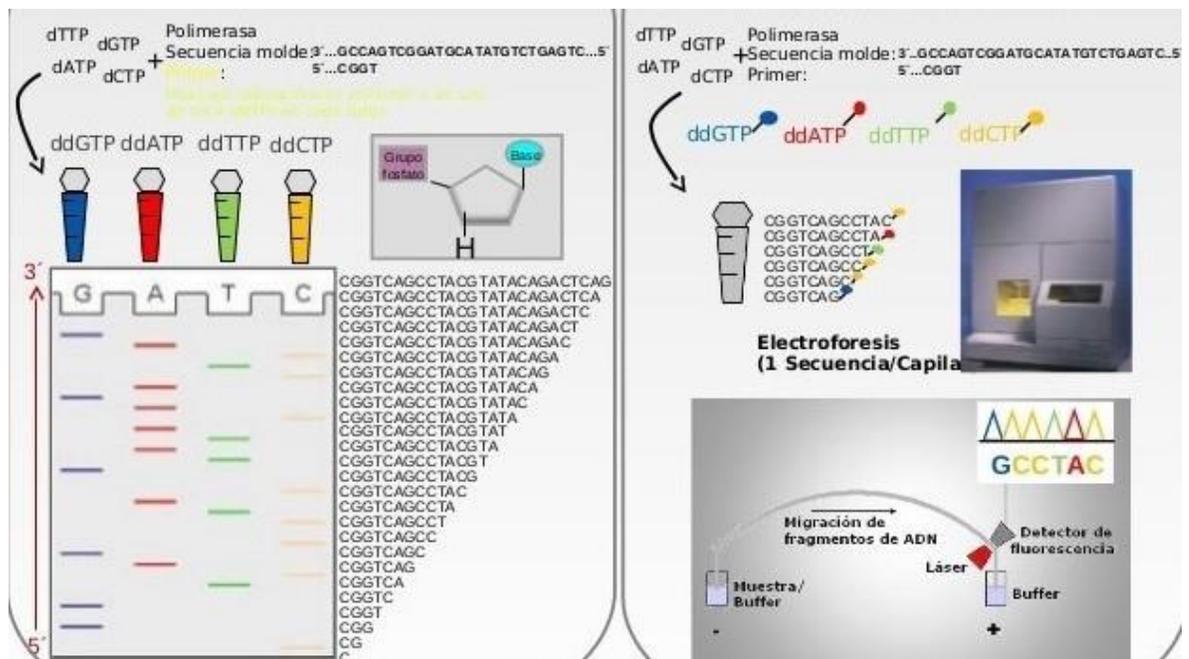
La secuenciación masiva o NGS por las siglas en ingles de *Next generation sequencing* hace referencia a la evolución de los métodos de secuenciación de ADN de terminación de cadena y digestión enzimática ideados por Fred Sanger y Maxam - Gilbert respectivamente, en la década de los 70, los cuales buscaban determinar la forma en que se agrupan los nucleótidos adenina, timina, guanina y citosina en

un fragmento de ADN, evidenciando de esta manera el orden en que estos aparecen en la cadena molde de ADN a medida que se sintetiza la hebra complementaria (18, 19).

El método de terminación de cadena ha sido el más usado desde entonces, y corresponde a reacciones separadas, donde cada una de ellas consta de una hebra de ADN molde, un cebador o iniciador, una ADN polimerasa, los cuatro nucleótidos de ADN y nucleótidos en estado didesoxi (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), los cuales presentan características particulares, ya que carecen de grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar, lo que los convierte en terminadores de la cadena de elongación al no permitir la formación del enlace fosfodiéster con otro nucleótido, además pueden estar marcados con determinado pigmento de color específico ligado a la base nitrogenada que servirá como punto de reconocimiento (18, 19).

El primer evento que ocurre en esta reacción corresponde a la desnaturalización de la hebra de ADN, a continuación, el *primer* o cebador se puede unir a la cadena molde sencilla y posterior a un aumento de temperatura la polimerasa también logra la unión e inicia la síntesis de una nueva cadena, de esta manera la polimerasa continua elongando la molécula de ADN hasta que por azar incluya un nucleótido en el que esté ausente el grupo hidroxilo, con lo cual se detendrá el proceso y nos dará como resultado fragmentos de ADN de distintos tamaños (18, 19).

Una vez terminada la reacción los fragmentos resultantes recién sintetizados son nuevamente desnaturalizados y sometidos a un proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida o electroforesis capilar dependiendo del caso, donde su velocidad de avance será inversamente proporcional a su tamaño, de esta manera podemos leer y reconstruir la secuencia de la hebra molde original bien sea por la localización de las bandas en el gel de poliacrilamida o a partir de los colores arrojados en los picos del cromatograma, dependiendo del equipo con el que se disponga, figura 3 (18-20).



Vall d'Hebron Barcelona Hospital, Dept. genética clínica y molecular, Plataforma de Genómica / Plataforma de Diagnóstico Molecular "Tecnologías de alto rendimiento en genómica" 2ª Parte: Tecnologías de ultrasecuenciación y de enriquecimiento de secuencia.H, 2012.

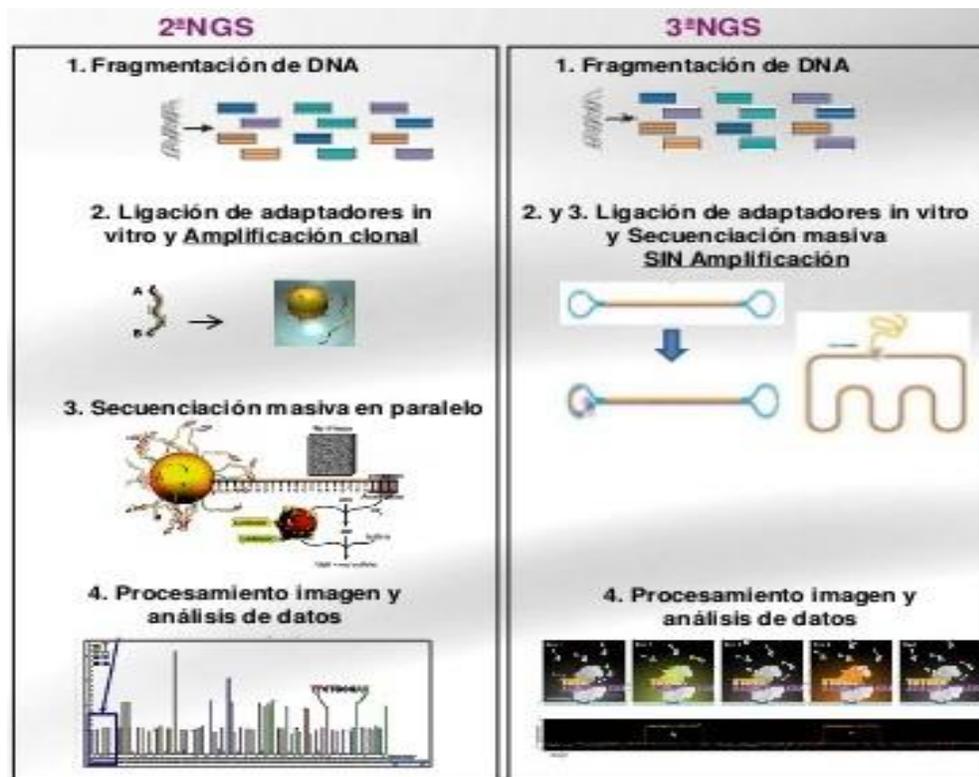
Figura 3. Esquema de secuenciación Sanger de terminación de cadena, a la izquierda método manual, con lectura de electroforesis en gel; a la derecha, método automatizado por electroforesis capilar.

A través de la historia han existido múltiples técnicas de secuenciación de ADN, pero debido a la complejidad en su ejecución o fiabilidad en sus resultados el método Sanger se ha mantenido vigente, gracias a su elevada eficacia y altísima calidad. Actualmente es utilizado como Gold estándar en la confirmación de resultados obtenidos por medio de NGS, sin embargo, a pesar de la automatización del proceso y de sus cualidades, este tipo de secuenciación es altamente costosa y obsoleta para ejecutar proyectos de gran envergadura (18, 21).

La alternativa que surge como solución a estos inconvenientes es la secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva en paralelo que se define como la tecnología que nos permite determinar en un solo experimento la secuencia de una o varias moléculas de ADN con un tamaño mayor a 1 millón de pares de bases, lo que se traduce en aumento de la capacidad de lectura del ADN al abarcar regiones

más grandes del genoma, al mismo tiempo que disminuye los costos e incrementa la velocidad de todo el proceso (22).

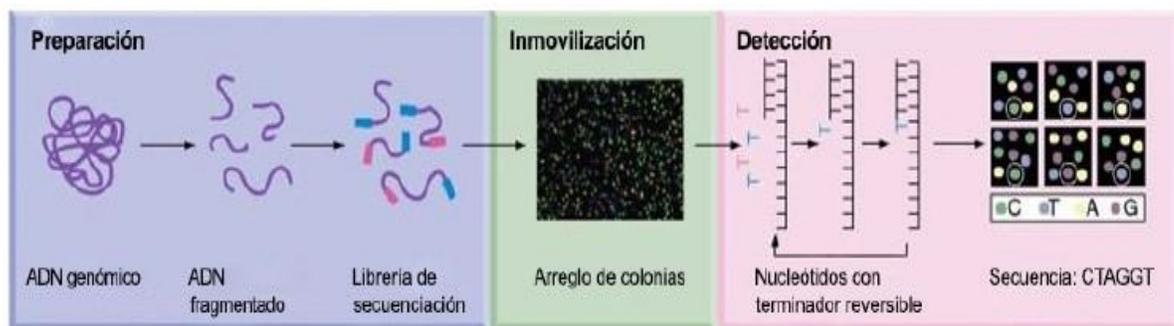
Las estrategias de las que se vale para hacer esto posible, es la realización de múltiples reacciones en paralelo, además de utilizar fragmentos más cortos que se manipulan simultáneamente en placas solidas o microchips, esto gracias al desarrollo que han tenido los secuenciadores de primera generación, que pasaron de tener una capacidad máxima de 96 secuencias de aproximadamente 500-1000 nucleótidos a la secuenciación de millones de fragmentos ejecutada por los secuenciadores de segunda y tercera generación permitiendo así lograr los objetivos buscados, figura 4 (4, 18, 21).



Vall d'Hebron Barcelona Hospital, Dept. genética clínica y molecular, Plataforma de Genómica / Plataforma de Diagnóstico Molecular "Tecnologías de alto rendimiento en genómica" 2ª Parte: Tecnologías de ultrasecuenciación y de enriquecimiento de secuencia.H, 2012.

Figura 4. Paralelo entre NGS de 2da y 3ra generación donde se evidencia la fragmentación y secuenciación en paralelo que las distingue de la técnica Sanger, además; observamos la ausencia de PCR en los secuenciadores de 3ra generación.

Sin importar el tipo de estudio en el que será utilizada o la plataforma del secuenciador usado en su ejecución, esta técnica siempre tendrá los mismos objetivos, además de realizarse con pasos muy similares; el primero de ellos es la extracción de ADN genómico del probando o caso índice, seguido de la disolución de la cadena molde en múltiples fragmentos de inferior tamaño, se usará además el método de captura si queremos realizar una secuenciación dirigida, posteriormente se realizará la secuenciación de las librerías fabricadas y por último el análisis de bioinformática mediante software específicos de los resultados obtenidos, figura 5 (23).



Pacheco Bautista, D., González Pérez, M., & Algreto Badillo, I. (2015). De la Secuenciación a la Aceleración Hardware de los Programas de Alineación de ADN, una Revisión Integral. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 36(3), 259-277. <https://dx.doi.org/10.17488/RMIB.36.3.6>

Figura 5. Flujo de trabajo de pasos fundamentales que realizan todas las plataformas de NGS. Preparación=colocación de adaptadores, creación de librerías; inmovilización= fijación a superficie sólida; Detección=captura de imágenes para interpretación.

Las grandes diferencias exhibidas por las diferentes casas comerciales se deben al tipo de secuenciador de alto rendimiento utilizado ya que cada uno maneja su propio protocolo de técnicas para la formación de las librerías y del método usado en la secuenciación final. La compañía Roche con su secuenciador GS-FLX 454 utiliza la PCR de emulsión para la creación del DNA que será usado como molde y la piro secuenciación como método de secuenciación, el cual está basado en la

bioluminiscencia, liberación del pirofosfato tras una serie de reacciones enzimáticas, que tienen como fin la síntesis de oxiluciferina la cual se va a traducir en imágenes lumínicas que serán interpretadas en flujogramas. Uno de los secuenciadores de segunda generación más utilizados en la actualidad es el equipo SOLEXA de la casa comercial Illumina el cual basa su tecnología en la PCR de puente y los terminadores de cadena reversibles para la creación del DNA molde y como método de secuenciación respectivamente, otro tipo de tecnología que no está basada en la polimerización de ADN si no que utiliza PCR de emulsión y secuenciación por ligación de octameros con emisión de fluorescencia, es la ofrecida por Applied Biosystems y su equipo ABI SOLID (Tabla 1) (24) (23-25).

Tabla 1. Diferencias de las principales plataformas de NGS de segunda generación.

Plataforma	Librería de secuenciación	Soporte	Generación de características	Reacción de secuenciación	Método de Detección
GS FLX	Adaptadores Lineales	Placa Pico-tituladora	Emulsión PCR	Síntesis	Piro-Secuenciación
Hiseq 2000	Adaptadores Lineales	Celdas de flujo	Puente PCR	Síntesis	Nucleótidos terminadores reversibles etiquetados con fluorescencia
SOLiD V4	Adaptadores Lineales	Celdas de flujo	Emulsión PCR	Ligación	Sondas de oligo-nucleótidos etiquetados con fluorescencia
CGA Platform	Adaptadores Circulares	Arreglos de nano-esferas de ADN	Amplificación circular rodante	Ligación	Sondas de oligo-nucleótidos etiquetados con fluorescencia
PacBio RS	Adaptadores de burbujas	Guías de onda en modo cero	Molécula única	Síntesis en tiempo real	Nucleótidos etiquetados con fluorescencia fosfo-vinculados

Pacheco Bautista, D., González Pérez, M., & Algreto Badillo, I.. (2015). De la Secuenciación a la Aceleración Hardware de los Programas de Alineación de ADN, una Revisión Integral. Revista mexicana de ingeniería biomédica, 36(3), 259-277. <https://dx.doi.org/10.17488/RMIB.36.3.6>

Las plataformas de NGS continúan manteniendo elevados precios además de presentar ventajas y desventajas entre unas y otras lo que dificulta su elección y no permite la estandarización de su uso, por lo que en los últimos años se han venido desarrollando una nueva gama de secuenciadores denominados de tercera generación los cuales buscan abaratar costos sin sacrificar calidad en sus

resultados, para ello compañías como Helicos Bios Ciencias, Pacific Biosciences desarrolladores de estos nuevos equipos basan su tecnología en un tipo de secuenciación de molécula única y en tiempo real adherida a una base sólida de nano poro, eliminando de esta manera la fase de PCR usada por los instrumentos de segunda generación, y evitando así el riesgo de incluir errores introducidos en la etapa de amplificación. Otro método introducido recientemente y que también utiliza tecnología de molécula única es el expuesto por ZS Genetics quienes adicionaron marcaje de bases con yodo y bromo particularmente para leer la secuencia de ADN directamente sobre una imagen por medio de microscopia electrónica (24-26).

Tabla 2. Diferencias de las principales plataformas de NGS de tercera generación.

Equipo	Compañía	Método de secuenciación	DNA molde	Longitud lecturas (pb)	Tiempo o carrera	Nt/carrera (Gb)
Helicos tSMS	Helicos BioSciences	Polimerasa	Molécula única	25-45	192	37
Pacific Biosciences	Pacific Biosciences	Polimerasa	Molécula única	1000	NA	NA
ZX Genetics	ZX Genetics	Microscopia electrónica	Molécula única	NA	NA	NA

Br. Cool Méndez Carlos Alberto Br. Encalada Salazar Rai Br. Jiménez Becerra Daniel Eduardo Mérida, Universidad Autónoma de Yucatán, Campus Ciencias de la Salud Facultad de Química 23 de junio 2017

Estas técnicas de secuenciación masiva nos brindan la posibilidad de hallar indels, traslocaciones y mutaciones puntuales principalmente, es usada tanto en el ámbito clínico como investigativo y está indicada para la secuenciación de exomas, paneles moleculares, estudio de cáncer, genes específicos, ARN y meta genomas (4).

5.3.1 PANEL MOLECULAR

Los paneles moleculares por NGS son utilizados en la práctica clínica y corresponden a la secuenciación de grupos de genes, abarcan el estudio de dos o más genes de los cuales ya se conoce su relación directa con un fenotipo

patogénico definido, lo que nos permite realizar una búsqueda dirigida a regiones *hot spots* previamente conocidas o la cobertura de genes completos (4, 7).

Su uso está indicado en casos de enfermedades que tengan un origen común como en el caso de las Rasopatías o enfermedades que presenten características de heterogeneidad genética y solapamiento, como ejemplo citaremos el caso de la poli neuropatía de Charcot Marie Tooth, ataxias, distrofias musculares, distonía, Parkinson, epilepsias y displasias esqueléticas (7).

Una desventaja importante que presentan estos exámenes es que al utilizar sondas dirigidas específicas no permitirían el hallazgo de nuevas mutaciones en otras regiones no contenidas dentro del paquete de genes a secuenciar (4).

5.3.2 EXOMA

El exoma conforma aproximadamente el 1.5% por ciento de todo el genoma y se encuentra formado por exones los cuales tienen la capacidad para codificar proteínas, los exones se encuentran interpuestos con regiones que no poseen la capacidad de síntesis de proteínas llamados intrones (7).

Este examen nos permite la búsqueda de variantes genómicas en los 20.000 genes que contiene el exoma de un individuo, lo que lo convierte en un examen complejo en su interpretación al arrojar aproximadamente 40.000 variantes génicas, por lo anterior; se recomienda su solicitud junto a la de los progenitores del paciente, en casos de estudios de cáncer se debe secuenciar simultáneamente los tumores y la persona afectada, de esta manera se tendrán referencias en caso de hallar algún tipo de desequilibrio y nos permitirá descartar variantes benignas (4, 7). Esta técnica se indica en resolución de casos complejos, con elevada heterogeneidad genética, donde han fracasado otras estrategias diagnósticas y hay ausencia de características clínicas específicas, además este tipo de secuenciación presenta un alto rendimiento en la búsqueda de enfermedades de carácter recesivo, mutaciones

nuevas aún no descritas o en la investigación de nuevos genes causantes de fenotipos anormales (27).

5.3.3 EXOMA CLINICO

Comprende una variación del exoma propiamente dicho, es también llamado exoma dirigido ya que se trata de un panel molecular gigantesco que contiene más de 5.000 genes asociados con fenotipo patológico, que están enfocados únicamente en la parte del genoma que codifica proteínas y sus regiones flanqueantes, cubriendo de esta manera tan solo el 20% del exoma completo, Su uso se recomienda en casos donde exista cierta sospecha de un síndrome específico, cuando los exámenes moleculares previos hallan fallado, o cuando estemos en presencia de patologías con heterogeneidad extrema donde no sea posible la realización de pruebas a padres de familia del paciente (27).

5.3.4 SECUENCIACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial humano (mtDNA) es el genoma de las mitocondrias, organelos celulares que cumplen funciones importantes a nivel de producción de ATP y procesos de fosforilación oxidativa, consiste en un material de doble cadena, circular, cerrado, independiente del resto del genoma humano, alberga 37 genes en total y está ubicado en gran parte de las células del cuerpo exceptuando los eritrocitos y las fibras del cristalino (28). La técnica de secuenciación del ADN mitocondrial, se refiere a la lectura únicamente del componente genético contenido en estos orgánulos, sin incluir el ADN nuclear. Se conocen múltiples mutaciones a nivel mtDNA, probablemente debido a la carencia de un sistema adecuado de reparación de DNA, su uso en la clínica se reserva para el estudio de enfermedades con componente neurológico y muscular de difícil diagnóstico, dentro de ellas encontramos el síndrome de Kearns-Sayre, síndrome de Pearson, síndrome de Leigh, neuropatía óptica de Leber entre otros (28).

5.3.5 SECUENCIACIÓN DE ÚNICO GEN

Hace referencia al estudio de un solo gen del cual se conoce en detalle su relación genotipo – fenotipo, es correcto inclinarnos por esta prueba monogénica como prueba de primera línea en diagnóstico clínico cuando tengamos una muy alta sospecha de encontrar determinada mutación en base a la revisión semiológica efectuada al paciente, en una enfermedad con poca heterogeneidad genética (29).

Dentro de este grupo de patologías podemos citar como ejemplo la fibrosis quística ocasionada por anomalías en el gen CFTR y la Acondroplasia la cual es producida casi en el 100% de los casos por alteraciones a nivel del gen FGFR3 (29).

El estudio monogénico también está indicado en la búsqueda de enfermedades con mecanismos patogénicos que no son detectados por medio de secuenciación Sanger, pero que se sabe son ocasionados por mutaciones presentes solo en el gen que se estudiará, como es el caso de patologías ocasionadas por mutaciones dinámicas de expansión de tripletes que observamos en el síndrome de X-frágil, corea de Huntington o estudios de metilación de la región 15q11-q13 para el síndrome de Prader Willi o Angelman (29).

5.3.6 SECUENCIACIÓN DEL GENOMA

Un genoma hace referencia a la totalidad del material genético de un organismo, el genoma humano fue secuenciado en su totalidad en el año 2003 tras aproximadamente 15 años de trabajo, gracias a este logro, hoy en día podemos contar con la secuenciación del genoma completo o *whole genome sequencing* (WGS) de una persona, esta técnica nos permite explorar aproximadamente entre el 85% a 95% de la totalidad un genoma humano, ofreciendo una importante ventaja al estudiar de manera simultánea el exoma, las secuencias intrónicas, intergénicas y el ADN mitocondrial. Lastimosamente su realización requiere de secuenciadores de gran capacidad, sumado esto a la complejidad en el análisis de la cantidad de información que suministra lo convierten en una técnica costosa, disponible casi

siempre con fines de investigación, no siendo utilizado con frecuencia en la práctica clínica diaria (8).

5.3.7 INTERPRETACIÓN DE EXÁMENES MOLECULARES

Los criterios usados para la interpretación de estos exámenes están basados en un consenso dirigido por el colegio americano de genética y genómica médica (ACMG) en compañía de la asociación de patología molecular (AMP), y el colegio de patólogos americanos, el cual fue verificado y aprobado por la sociedad de genética europea en el año 2015, quienes concluyen la estratificación de los hallazgos moleculares en cinco estadios, variante patógena, variante probablemente patógena, variante de significado incierto, variante probablemente benigna y variante benigna. Estos estadios se deben aplicar a todas las pruebas de secuenciación masiva (paneles, exomas, genomas, genes individuales) y su resultado se debe consignar siempre en el informe final de cada laboratorio (30, 31).

Esta clasificación se concluye a partir de un análisis de frecuencia alélica, cobertura y localización de las variantes, instrumentos obtenidos en bases de datos que comparan polimorfismos con variantes patológicas, además de programas bioinformáticos *in silico* los cuales utilizan algoritmos avanzados para predecir el posible efecto benigno o patógeno de la variante a estudio, lo que conocemos como rendimiento diagnóstico el cual nos validara o confirmara un diagnóstico molecular (32).

Una variante clasificada como patogénica corresponderá a una mutación de la cual existen múltiples reportes y estudios que indican su relación como causante de un fenotipo patológico, probablemente patogénica hace referencia a una variación de la cual la literatura no respalda en un 100% su carácter de patogénica, pero los programas *in silico* advierten su posible efecto patógeno (33).

La frecuencia alélica se refiere a la frecuencia de aparición del alelo menos común en una población, de esta manera podemos tomarla como un índice de normalidad

que nos indicará que una variante es benigna al tener una frecuencia superior al 2% en la población general, si esta variante no ha sido reportada en bases de datos y los programas bioinformáticos predicen su nivel de patogenicidad como bajo, la clasificaremos como una variante de significado clínico incierto - probablemente benigna y si tanto los sistemas de predicción como las bases de datos indican su relación con pacientes sanos, diremos que es una variante benigna (33).

El ítem variante de significado clínico incierto es ambiguo, ya que a pesar de tratarse de una variante no reportada en bases de datos conocidas si podría afectar el producto génico, si tomamos la localización se podría tratar de una variante ubicada en los exones o intrones ocasionando cambios a nivel de aminoácido o en sitios de *splicing* respectivamente ocasionando daños en la codificación proteica y originando productos con pérdida de función o inactivos. En este tipo de variantes los predictores informáticos sumados a reportes clínicos de otros profesionales y la experiencia propia del examinador jugarán un papel relevante en la caracterización del nivel de patogenicidad de la variante (33).

5.4 AMPLIFICACIÓN DE SONDA DEPENDIENTE DE LIGADURA MULTIPLEX

La amplificación de sonda dependiente de ligadura multiplex (MLPA) es una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa que permite la detección del número de copias de hasta 50 secuencias de ADN en una sola reacción con un solo par de cebadores, una sonda de oligonucleótidos contiene la secuencia que será reconocida por el cebador directo mientras que la otra contiene la secuencia que se unirá al cebador inverso, cuando ambas sondas de oligonucleótidos se hibridan con su blanco respectivo, ocurre el fenómeno de ligación y se convierten en una sonda única, esta reacción es la que le da su característica distintiva, sin esta ligación no habrá amplificación. El primer paso consiste en la amplificación de las sondas de oligonucleótidos que son complementarias a las secuencias blanco del probando, posteriormente son reconocidas e identificadas por medio de electroforesis en gel o capilar para su posterior lectura con software específicos que registran picos de

colores dados por fluoróforos que se utilizaron previamente en su marcaje (34, 35). Esta técnica fue desarrollada en el año 2002 por la empresa MRC - Holland y está indicada en la detección de aneuploidias, diagnóstico prenatal, síndromes de microdelección y diagnóstico molecular de enfermedades genéticas principalmente distrofia muscular de Duchenne y ataxia espinocerebelosa, esta técnica si permite el análisis de metilación del ADN; dentro de sus características destaca que no es necesaria la realización de cultivo celular para su desarrollo, además de emplearse muestras con cantidades mínimas de ADN, alrededor de 20ng es suficiente; lo que le otorga una gran ventaja frente a pruebas citogenéticas, los costos de su ejecución son por mucho más favorables que otras pruebas moleculares. A pesar de ser una técnica con una sensibilidad y especificidad alta, en los últimos años ha ido perdiendo jerarquía, debido al advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva. Sin embargo, vale la pena su mención gracias a sus grandes aportes en el área de diagnóstico molecular. (36).

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La evaluación realizada en este trabajo, sobre las diferentes técnicas moleculares en diagnóstico genético, obedece a un estudio de tipo observacional - descriptivo de serie de casos. El estudio fue realizado en pacientes que asistieron a la consulta médica de genética durante el periodo comprendido entre febrero a diciembre del año 2019 y retrospectivo transversal debido a la utilización de fuentes de datos como las historias clínicas de pacientes conocidos con anterioridad por este servicio. Los datos hallados se unificaron y fueron manejados como una base de datos única.

6.2 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en las instalaciones del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, que se encuentra ubicado en la ciudad de Neiva departamento del Huila, el cual es un importante centro, referente regional en salud y académico del sur colombiano.

Los pacientes que participaron del estudio fueron los pertenecientes al área de consulta externa de genética clínica, así como pacientes hospitalizados de los servicios de neonatología, Unidad de Cuidado Intensivo pediátrica, Infectología pediátrica y ginecología, en donde se intervino como especialidad Interconsultante.

6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se tuvieron en cuenta como población de estudio los pacientes que fueron atendidos en las instalaciones del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo en el periodo comprendido entre febrero a diciembre del año 2019 en cualquiera de los servicios mencionados anteriormente y las historias clínicas de pacientes conocidos por el servicio de genética atendidos fuera de este periodo.

Como muestra en la investigación se incluyeron 208 pacientes que cumplían los criterios de inclusión y contaban con historial clínico completo, todos ellos contaban con uno o más de las siguientes características: discapacidad intelectual, retraso global del neurodesarrollo, espectro autista, epilepsia, baja talla, retraso del crecimiento intrauterino o posnatal, microcefalia, macrocefalia, facies dismórficas, cáncer o cualquier patología sin diagnóstico etiológico claro, por lo que se solicitaron ayudas diagnósticas moleculares.

6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes atendidos en el servicio de genética clínica del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo desde el periodo comprendido entre febrero a diciembre de 2019 a quienes se les solicitó algún tipo de estudio paraclínico (técnicas moleculares de secuenciación de nueva generación, a-CGH) y tuvieron seguimiento posterior.
- Pacientes con historial clínico conocido por el servicio de genética atendidos fuera de este periodo quienes contaban con estudio molecular y seguimiento longitudinal.

6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con patología de origen genético en quienes su fenotipo era indicador de un diagnóstico etiológico y por ende no se solicitó examen molecular confirmatorio.
- Pacientes a quienes se les solicitó estudio molecular el cual no fue realizado y no tuvieron seguimiento longitudinal posterior.
- Historias clínicas de pacientes que no contaban con datos claros o concisos sobre su patología de base ni contaban con el estudio molecular solicitado.

6.6 PROCEDIMIENTOS PARA RECOLECCIÓN Y ANALISIS DE DATOS

La recolección de datos se realizó con previa firma del consentimiento informado, (Ver Anexos) a través de la anamnesis en consulta médica, a la cual se asistió durante todo el periodo de 2019, con una intensidad horaria de seis horas diarias, además se realizó una revisión documental consistente en el análisis de las historias clínicas que se encuentran en el archivo del departamento de genética, incluyendo a todos los pacientes a quien se les solicitó algún tipo de examen molecular. Los datos obtenidos se agruparon en una base de datos previamente diseñada (Ver Anexos), la cual contiene las variables necesarias para una recolección completa y adecuada de los datos requeridos para el desarrollo de esta investigación. Posteriormente se realizó un análisis estadístico descriptivo univariado mediante el software STATA, para calcular la totalidad de pacientes, además de la discriminación del sexo, motivo de consulta, situación geográfica, hallazgos patogénicos y tasa diagnóstica de los diferentes exámenes utilizados.

6.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo se considera una investigación sin riesgo, está amparada en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 referente a la investigación en seres humanos parágrafo A y B. Consiste en una investigación observacional y documental retrospectiva donde no realizamos ningún tipo de intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaron en el estudio. Además se obedecieron los estatutos, se respetó la dignidad y se protegieron los derechos a la privacidad y confidencialidad de la información obtenida durante la realización del examen físico, resultados de exámenes solicitados y de la información consignada en los archivos clínicos, a través del software INDIGO del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, el cual restringe el paso de personal no autorizado; además de bases de datos y herramientas de información a las cuales solo tuvo acceso el personal a cargo de la investigación.

Para la ejecución de este proyecto se obtuvieron las respectivas autorizaciones por parte de la vicerrectoría académica de la Universidad Surcolombiana y el comité de ética del Hospital Universitario (Ver Anexos), además los autores declaran ausencia de algún tipo de conflicto de interés con respecto al presente trabajo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 RESULTADOS

Se estudiaron 208 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión de nuestro estudio, se analizaron y describieron sus características clínicas junto con el resultado de su respectivo examen molecular, se incluyeron 108 (52%) varones y 100 (48%) mujeres de todas las edades, la media de edad en el momento de la realización del examen molecular fue de 15 años, de ellos 177 (85%) eran naturales de la ciudad de Neiva y municipios aledaños, 22 (10,5%) del departamento de Caquetá, 2 (0,96%) del departamento del Tolima (planadas, Ibagué), 2 (0,96%) de la ciudad de Bogotá, 2 (0,96%) de la ciudad de Cali, 2 (0,96%) del departamento del Cauca (Inza, Popayán) y 1(0,48%) del departamento del cesar (Codazzi), todos ellos procedentes de los departamentos del sur del país (Huila, cauca, Caquetá) a excepción de un paciente proveniente del municipio de Puerto Asís en el departamento de Putumayo, figura 6.

El motivo de consulta más frecuente fue discapacidad intelectual y/o retraso global del desarrollo, aislado o asociado a otras anomalías, observado en 84 pacientes (40,3%), en 21 (10%) personas se identificó algún tipo de trastorno neurológico (autismo, ataxia, hipotonía, polineuropatías, epilepsia), 16 (7,6%) habían padecido cáncer o tenían riesgo de cáncer por antecedentes familiares, 15 (7,2%), alteraciones de talla (baja, alta), 14 (6,7%) presentaban diferentes tipos de problemas a nivel metabólico (trombofilia, diabetes tipo mody, fiebre, fibrosis quística, diabetes insípida nefrogénica, pubertad precoz, acidosis tubular, arritmia

cardiaca), 11 (5,2%) pacientes que presentaban diferentes tipos de anomalías congénitas aisladas únicas (malformaciones cardíacas, hipoplasia radial, pectus excavatum, microtia, aniridia, agenesia renal, luxación del cristalino), 8 (3,8%) presentaron como motivo de consulta microcefalia, 7 (3,3%) tenían problemas de tejido conectivo (hiperelasticidad, hiperlaxitud), 7 (3,3%) presentaban anomalías osteomusculares (distrofias musculares, artrogriposis, agenesia del sacro), 6 pacientes (2,8%) presentaban rasgos faciales dismórficos, 6 (2,8%) tenían problemas relacionados con la piel y tejido ectodérmico (ictiosis, manchas café con leche, anoniquia), 4 (1,9%) tenían problemas relacionados con macrosomía (hemihipertrofia, macrocefalia, macrodactilia), además; se estudiaron 9 (4,3%) familiares en primer grado de los pacientes en estudio, para dilucidar si su mutación fue heredada o de novo (Tabla 3).

Durante el periodo de realización de las técnicas moleculares no falleció ningún paciente. Antes del estudio genético molecular, se habían realizado pruebas orientadas al estudio etiológico de la enfermedad, la mayoría de los pacientes se habían estudiado mediante pruebas de neuroimagen como resonancia magnética cerebral y estudio para enfermedades metabólicas, otros estudios realizados comprendían: potenciales evocados auditivos y visuales, estudios cardíacos, biopsia muscular, estudios neurofisiológicos de electromiografía y electroencefalograma, a 138 (66%) pacientes se les realizó cariotipos de los cuales 6 (2,8%) mostraban hallazgos anormales, 3 de ellos brindaron diagnósticos correspondientes a síndrome de Cri du Chat , Síndrome de Wolf Hischhorn y Síndrome de Down, los tres exámenes restantes, correspondían a hallazgos de cromosomas marcadores los cuales no explicaban el fenotipo del paciente (Tabla 4), otro tanto fue sometido a exámenes genéticos orientados a descartar diferentes trastornos, dependiendo de sus hallazgos clínicos: estudio para síndrome de X-frágil, MLPA en búsqueda de grandes mutaciones, estudios de expansión de tripletas para búsqueda de mutaciones dinámicas y estudios de metilación de regiones específicas, sin hallazgos patológicos en los mismos. La media de tiempo

desde la solicitud del estudio genético específico hasta su realización, fue de 13 meses.

La técnica genética más utilizada fue la a-CGH con 126 (60%) solicitudes, seguido de paneles moleculares para estudio de varios genes el cual se requirió en 56 (26%) oportunidades, estudios de secuenciación de genes específicos se utilizó en 23 casos (11%), mientras que la secuenciación de exoma clínico fue empleada en 6 (3%) pacientes; tres de ellos solicitados como exámenes de segunda línea, secundario a un resultado no satisfactorio de otros exámenes moleculares, para un total de 211 pruebas solicitadas.

Tras el análisis del estudio genético se identificaron 66 (31,2%) pacientes con alteraciones patogénicas, 15 (7,1%) probablemente patogénicas, 66 (31,2%) variantes de significado clínico incierto, 10 (4,7%) pacientes presentaron regiones con pérdida de heterocigosidad, 1 (0,47%) variantes benignas, 1 (0,47%) probablemente benignas, 1 (0,47%) variación catalogada como polimorfismo y en 51 (24,1%) exámenes no se encontraron variaciones en el número de copias o algún tipo de aberración cromosómica, 20 (9,4%) exámenes arrojaron más de un resultado, de los cuales solo se tuvo en cuenta el más relacionado con el contexto y escenario clínico del paciente. Lo anterior nos arroja un rendimiento diagnóstico conjunto de 39%, el cual se eleva a 44%, si sumamos hallazgos clasificados como VOUS y LOH, que tras su análisis nos dirigen hacia un posible diagnóstico.

En 5 casos, tras la identificación de una alteración genética en el paciente, se logró un diagnóstico en sus familiares; Individualmente el rendimiento diagnóstico del exoma fue superior al resto con 66%, seguido de los estudios de panel molecular 61%, la secuenciación de genes específicos obtuvo un éxito en tasa diagnóstica de 56% y por último la a-CGH logró un 32% de diagnósticos (Tabla 5). En cuanto a los cambios genómicos patogénicos no se encontró relación entre el tamaño de la variación, medido en bases nitrogenadas (Mb, Kb) y su fenotipo patológico, de estos la mayoría fueron mutaciones puntuales con 49 (53,2%) hallazgos, los demás correspondieron a microdeleciones con 28 (30,4%) hallazgos, 12 (13,2%)

microduplicaciones y 3 (3,2%) LOH (Tabla 6), las regiones del genoma más afectadas fueron la 22q11.21 encontrada en 6 pacientes en estado de delección, la región 15q11 hallada en 4 pacientes, tres de ellos en estado de delección y una en estado de duplicación, otras variaciones comprendieron, la del 1q21.1, del 5p15.33, dup9q34, del Xp22.3, encontradas en dos pacientes cada una (Tabla 7), las variantes patógenas restantes no tenían ningún tipo de semejanza y se encontraron como variantes únicas.

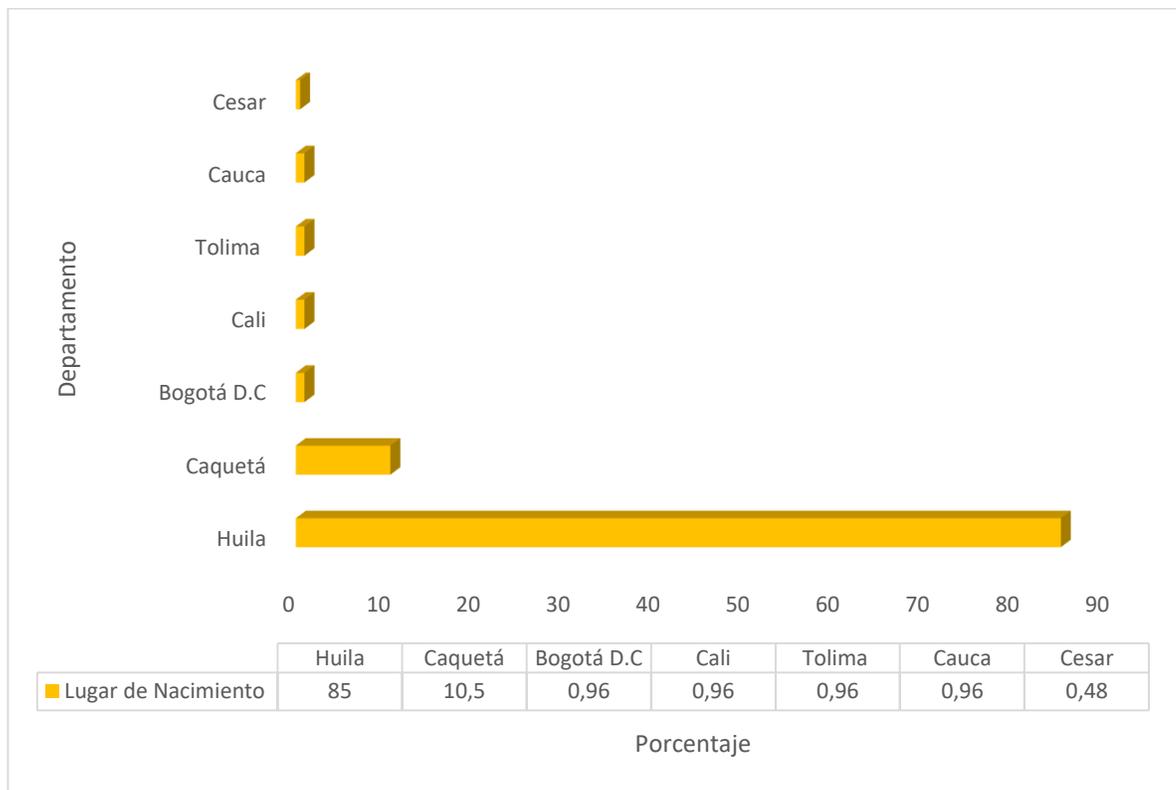


Figura 6. Porcentaje de nacimientos de los pacientes por Departamentos.

Tabla 3. Hallazgo clínico principal y/o motivo de consulta.

Hallazgo clínico	Cantidad	Hallazgo clínico	Cantidad
Aniridia	1	Madre de paciente en estudio	6
Anoniquia	1	Macula color café con leche	2
Artrogriposis	1	Meningoencefalocele occipital	1
Ataxia	5	Microcefalia	8
Autismo	2	Microtia	1
Acidosis tubular renal	1	Miopatía	1
Cáncer de endometrio	1	Mucopolisacaridosis	2
Cáncer de ovario	2	Padre de probando	2
Cáncer de seno	2	Paladar hendido	1
Cáncer familiar	8	Parálisis cerebral espástica	2
Diabetes insípida nefrogénica	1	Parkinson	1
Diabetes tipo Mody	1	Pectus excavatum	1
Dimorfismo facial	6	Polineuropatía	3
Distrofia de retina	1	Poliposis múltiple	1
Distrofia muscular	3	Pubertad precoz	1
Doble arco aórtico	1	Regresión caudal	1
Epilepsia	2	Retraso del neurodesarrollo	84
Esclerosis tuberosa	2	Síndrome de Alport	1
Esquizencefalia	1	Talla baja	12
Estenosis del píloro	1	Talla alta	3
Extrofia de vejiga	1	Tetralogía de Fallot	1
Fibroadenomas - lipomas	1	Trombofilia hereditaria	1
Fiebre recurrente	1	Tumor ocular	1
Fracturas patológicas	1		
Gastrosquisis	1		
Hemihipertrofia	1		
Hermana con fibrosis quística	2		
Hidrocefalia	1		
Hijo con síndrome de Noonan	1		
Hiperelasticidad – hiperlaxitud	7		
Hiperplasia suprarrenal congénita	2		
hipoacusia	1		
hipoplasia radial	1		
hipotonía	1		
historia familiar de arritmia	1		
ictiosis	1		
luxación del cristalino	1		
macrocefalia	2		
macroductilia	1		

Tabla 4. Hallazgos patogénicos en pacientes con examen previo de cariotipo

Examen	Cantidad	Anormal	Cantidad	Resultado patogénico
▪ Cariotipo	138	6		
▪ Panel molecular			15	9
▪ Secuenciación de Gen			8	3
▪ Exoma			2	2
▪ aCGH			113	36
Total			138	50

Se aclaró y/o confirmó un diagnóstico en 50 pacientes de los 138 a los que se solicitó cariotipo previamente, el cual había arrojado resultados anormales en 6 casos solamente.

Tabla 5. Rendimiento diagnóstico individual y total de las pruebas moleculares.

Examen	Cantidad	Resultado patogénico	Rendimiento
Cariotipo	138	6	2,8
a-CGH	126	41	32
Panel molecular	56	34	61
Secuenciación Gen	23	13	56
Exoma clínico	6	4	66
Total	211	92	44

a-CGH: hibridación genómica comparativa con microarrays, cantidad: número de veces que se solicitó el examen. En el resultado total, no se tuvieron en cuenta los parámetros correspondientes al cariotipo.

Tabla 6. Frecuencia del tipo de cambio patogénico.

Tipo de mutación	Cantidad	Porcentaje
Mutación puntual	49	53,2 %
Microdeleciones	28	30,4 %
Microduplicaciones	12	13,2 %
LOH	3	3,2 %
Total	92	100 %

LOH: Región con pérdida de heterocigosidad

Tabla 7. Regiones genómicas afectadas en más de un paciente.

Tipo de mutación	Región	Cantidad
Deleción	22q11.21	6
Deleción	1q21.1	2
Deleción	5p15.33	2
Deleción	15q11	3
Duplicación	15q11	1
Deleción	Xp22.3	2
Duplicación	9q34	2
Total		18

Cantidad: Número de pacientes con la mutación.

7.2 DISCUSION

El diagnóstico genético hace referencia al resultado positivo de una prueba molecular, en un individuo en riesgo o sospechoso de determinado padecimiento, en este estudio se analizaron 211 resultados de paraclínicos, provenientes de 208 pacientes, con diferentes y variadas anomalías fenotípicas, en búsqueda de una causa para su enfermedad. En el 44% de pacientes se identificó una alteración a nivel genómico, obteniendo criterios de causalidad para brindar un diagnóstico etiológico genético, este porcentaje elevado nos indica la utilidad clínica de estas técnicas moleculares. Al comparar nuestro estudio con los realizados por investigadores del laboratorio de citogenética molecular de la Universidad de Chile y lo realizado por Vianna GS y Jehee FS en Brasil (37), quienes reportan tasas diagnósticas de la a-CGH que oscilan entre el 19% y el 29% en población chilena y brasileña respectivamente, observamos que nuestro estudio está cercano a la media de Latinoamérica, con un resultado positivo de la a-CGH de 32%, el resultado superior de este trabajo se debe probablemente a la fecha de publicación de los resultados chilenos y brasileños, ya que el gran avance alcanzado en los últimos años en cuanto a interpretación de resultados, nos lleva a señalar como patológica, una alteración genómica antes desconocida. Otros resultados con grupos poblacionales diferentes, corroboran la fiabilidad de la aCGH, como observamos en el trabajo publicado en el año 2020, por Turgay Cokyaman y colaboradores (38) quienes estudiaron un grupo de 155 pacientes, todos ellos con trastornos neurocognitivos no diagnosticados y/o fenotipo dismórfico, concluyendo para este grupo de pacientes, que aCGH aumenta la tasa diagnóstica en 25% a 30%. Un estudio publicado en marzo de 2020 por el italiano Marco Baccarine y su grupo de investigación (39) muestra evidencia del uso de aCGH en el estudio de pacientes con trastornos neuropsiquiátricos, específicamente trastorno del déficit de atención (TDAH) asociado o no a trastornos del espectro autista (TDA), ellos tomaron a 98 niños con los diagnósticos mencionados y aplicaron la prueba de aCGH, obteniendo un resultado positivo en el 21% de los pacientes, este porcentaje inferior comparado con nuestro estudio se debe posiblemente a que fue dirigido a un grupo poblacional

especifico que presentan TDAH, otro estudio llevado a cabo en el hospital Mackay Memory de la ciudad de Taiwán y publicado a mediados del año 2019, reporta una tasa diagnóstica de 46,3% en pacientes con algún grado de discapacidad intelectual o déficit cognitivo (40). Un estudio más robusto fue el realizado por el departamento de Genética Médica del Hospital Universitario Brno en República Checa, con un total de 542 niños quienes presentaban retraso del neurodesarrollo, todos se examinaron mediante la técnica de aCGH, encontrando en 177 (32,7%) de ellos, CNV con potencial relevancia clínica (41). A pesar de que los estudios mencionados se realizan en diferentes regiones geográficas y teniendo en cuenta la variabilidad genética que esto conlleva, nos demuestran que la prevalencia de este tipo de patologías es similar en todo el mundo, además que la técnica molecular aCGH es una poderosa herramienta de diagnóstico. En cuanto al poder diagnóstico de las NGS, un estudio del departamento de neurología del *Boston Childrens Hospital*, dirigido a 125 pacientes con algún tipo de Epilepsia sin etiología clara, reporta una tasa diagnóstica del 40%, posterior a la realización de la técnica molecular Exoma a cada uno de los participantes y tras encontrar variantes patógenas en 50/125 pacientes (42), en nuestra cohorte de pacientes el rendimiento diagnóstico del exoma fue de 66%, esto es consecuencia de que la muestra utilizada en nuestro estudio fue de menor tamaño y abarcaba un número más grande de patologías, no solamente las de origen neurológico, otro estudio realizado por Elisabeth Castellanos y colaboradores muestra un grupo de 48 pacientes con sospecha clínica de alguna Rasopatía, por lo que se les realizó un panel molecular que contenía genes relacionados con este grupo de enfermedades, encontrando mutaciones patógenas en 21 de ellos, incluyendo el gen de la Neurofibromatosis (*NF1*) y *SPRED1* en pacientes que no presentaban signos clásicos de esta patología, lo que equivale a una tasa diagnóstica del 44% (43), en nuestro estudio el potencial diagnóstico de los paneles moleculares fue superior con un 61%, ya que como en el caso anterior, no nos enfocamos a una enfermedad en particular, solo a la técnica diagnóstica que se usa para el estudio de diferentes cuadros clínicos. Otra ventaja de las técnicas de NGS es que permiten el descubrimiento de nuevas

mutaciones, las cuales pueden ser la causa de enfermedades ya conocidas que no tienen un origen claro o incluso desconocidas, como es el caso del denominado síndrome *TRAF7*, el cual fue descrito en mayo del 2020, tras realizar secuenciación de exoma dirigido y transcriptoma, con posterior validación y confirmación por secuenciación Sanger, en un grupo de pacientes que presentaban problemas de neurodesarrollo, asociado en algunas ocasiones a Ductus arterioso permeable, cuello corto, pectus carinatum y facies particulares con blefarofimosis; este cuadro había sido descrito tan solo en 7 pacientes pero tras la realización de las pruebas de secuenciación masiva este número se elevó a 45, los cambios patogénicos hallados fueron mutaciones heterocigotas de sentido erróneo en el gen *TRAF7*, de donde deriva su nombre (44). En general estos resultados nos acercan a los valores reportados en la literatura mundial, sumado esto al rendimiento diagnóstico bajo del cariotipo, se confirma la relevancia clínica significativa de estas tecnologías y fortalece el requerimiento de su implementación inmediata. Un punto desfavorable de esta investigación, es que la mayoría de participantes evaluados provienen de regiones contiguas del sur del país, por ende, es difícil extrapolar y establecer la prevalencia de este tipo de patologías en toda la población colombiana. Es importante destacar que no se encontró una relación significativa entre un hallazgo molecular patológico y variables como sexo, edad y número de malformaciones. En otro estudio latinoamericano realizado por Lay-son y colaboradores (45), se encontró una asociación protectora entre el sexo femenino y la menor prevalencia de anomalías genéticas, en nuestro estudio a pesar de un mayor número de hombres se encontró una mayor cantidad de hallazgos patogénicos en el género femenino con 56,52% en comparación con un 43,48% encontrado en el género masculino. Por otra parte, un tema relevante y quizá el más importante para nuestro sistema de salud, son los costos elevados de estas herramientas, algo contradictorio, si tenemos en cuenta estudios como el realizado por Stephen Kingsmore del Instituto de Medicina Genómica de los Niños Rady en San Diego, California, EE.UU, donde se demostró en una cohorte de 42 pacientes, que la realización precoz de secuenciación de genoma completo en niños hospitalizados

en unidades de cuidado intensivo, aumenta drásticamente la velocidad de diagnóstico, ellos reportan un ahorro de hasta 2 millones de dólares en costos de atención médica en este grupo de pacientes, gracias a la administración de tratamiento médico personalizado y a la no realización de pruebas de rutina no concluyentes, lo que deriva en disminución de estancias hospitalarias y mejoría en cifras de morbilidad y mortalidad (46), otro estudio denominado INSIGHT1, consistió en la realización de secuenciación de genoma completo a un grupo de pacientes pediátricos menores de 4 meses, quienes se encontraban hospitalizados en una Unidad de Cuidado Intensivo y presentaban patologías sin etiología establecida, sus resultados demuestran que la tasa diagnóstica de este examen es por mucho, más elevada que las pruebas genéticas de rutina y que la medicina de precisión mejora el pronóstico de vida y disminuye notablemente gastos de hospitalización, al reemplazar el diagnóstico clínico y el manejo empírico con diagnóstico genético y tratamiento diferenciado por genotipo (47). Según el fondo colombiano de enfermedades de alto costo, las atenciones en los servicios de salud de las enfermedades huérfanas, de las cuales el 80% son de origen genético, están por encima del percentil 95% y se establecen allí por varios años, debido a su carácter de cronicidad y a que su diagnóstico, según datos de gestión de riesgo tarda más de 5 años, de esta manera podemos entender que la realización de exámenes moleculares, si tiene una relación costo beneficio favorable, ya que el diagnóstico oportuno y la consejería genética adecuada nos permitirán realizar una intervención poblacional, fortaleciendo los programas de promoción y prevención de enfermedades, disminuyendo el riesgo de ocurrencia y recurrencia de una enfermedad genética en una familia, lo que a su vez tendrá impacto directo en la protección financiera brindada por la sociedad a estos pacientes, generando rentabilidad a largo plazo dentro del sistema.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 CONCLUSIONES

- El rendimiento diagnóstico individual de la técnica aCGH fue de 32%, la técnica de NGS obtuvo un rendimiento de 60%, en conjunto la tasa diagnóstica de las técnicas moleculares aplicadas a la población de estudio fue de 44%, resultados muy semejantes a la media encontrada en diversos estudios a nivel mundial, esto refuerza su importancia clínica significativa.
- Un conocimiento avezado en dismorfología asociado al entendimiento de los mecanismos patogénicos y patrones de herencia de los diferentes síndromes genéticos, conllevan a un diagnóstico temprano, esto se traduce en una baja morbimortalidad de los afectados y disminución de la incidencia y recurrencia familiar de estas enfermedades.
- Encontramos evidencia a favor del uso de las técnicas moleculares como exámenes de primera línea en el manejo médico de los pacientes con retraso del desarrollo, fenotipo dismórfico, cáncer o cuadros clínicos sin causa establecida.
- Las técnicas moleculares de nueva generación son útiles en el diagnóstico de patologías de origen genético ya que nos permiten evidenciar el aumento en la prevalencia de aberraciones cromosómicas imperceptibles con el cariotipo.
- Es correcto el uso simultáneo de un estudio molecular y el cariotipo, ya que nos permitirán la detección e identificación de síndromes de microdelección/microduplicación y mutaciones puntuales, sin dejar de lado las ventajas ofrecidas por las técnicas clásicas de citogenética.

8.2 RECOMENDACIONES

- Debemos desarrollar programas que faciliten y regulen el acceso obligatorio a exámenes moleculares de última generación en los casos donde sean indicados, ya que es claro su alto rendimiento diagnóstico y su impacto directo en el pronóstico y manejo de los afectados.
- Los exámenes con resultados clínicos clasificados como variantes de significado incierto son evidencias emergentes que nos pueden brindar un diagnóstico, por lo anterior es nuestro deber reportar este tipo de mutaciones en pro del enriquecimiento de la literatura médica y bases de datos de entes territoriales de salud.
- Un gran porcentaje de la población de estudio eran personas con un bajo nivel sociocultural, provenientes de estratos socioeconómicos bajos, los cuales contaron con un escaso o nulo control prenatal, debemos establecer medidas de educación sexual y planificación familiar dirigido a este grupo de personas en estado de vulnerabilidad.
- Debemos incrementar el entrenamiento en dismorfología, manejo de enfermedades metabólicas y patologías de origen genético, en todas facultades de medicina tanto a nivel de pregrado como de posgrado; promoviendo de esta manera el enfoque clínico correcto de estos pacientes desde los primeros niveles de atención.
- Se debe proponer la integración y educación continua del personal médico involucrado en el manejo de las patologías de origen genético mejorando así la utilización e interpretación de las pruebas genéticas al tiempo que mejorará la calidad y rapidez en el diagnóstico.

- Proponer mecanismos de intervención en pro del mejoramiento en la atención médica de los pacientes que padecen enfermedades genéticas, así como de programas para el apoyo a familiares y cuidadores de estos pacientes.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castells-Sarret N, Cueto-Gonzalez AM, Borregan M, Lopez-Grondona F, Miro R, Tizzano E, et al. Comparative genomic hybridisation as a first option in genetic diagnosis: 1000 cases and a cost-benefit analysis. 2018;89(1):3-11.
2. Carrillo Fontalvo G. Contribución al diagnóstico oportuno en un paciente con síndrome Williams-Beuren SWB. 2019.
3. Soto Insuga V. Análisis de utilidad del estudio genético en las epilepsias percibido por familiares y personal médico. 2018.
4. Calabria I, Pedrola L, Berlanga P, Aparisi MJ, Sánchez-Izquierdo D, Cañete A, et al. El nuevo reto en oncología: la secuenciación NGS y su aplicación a la medicina de precisión. Anales de Pediatría. 2016;85(5):273.e1-.e7.
5. Saldarriaga W, García-Perdomo HA, Arango-Pineda J, Fonseca JJAjoo, gynecology. Karyotype versus genomic hybridization for the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities: a metaanalysis. 2015;212(3):330. e1-. e10.
6. Zarate I, Castillo MC, Garcia N, Suarez F, Gutierrez CA, Umaña AJUm. Análisis clínico epidemiológico de factores asociados a malformaciones congénitas ECLAMC-Hospital Universitario San Ignacio junio-diciembre de 2001. 2002:121-7.
7. Md SS-G, Diego-Álvarez D, Buades C, Romera-López A, Pérez-Cabornero L, Valero-Hervás D, et al. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES GENÉTICAS: DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO AL DIAGNÓSTICO GENÓMICO CON LA SECUENCIACIÓN MASIVA. 2015;26(4):458-69.
8. Lay-Son RG, León PLJRcdp. Perspectivas actuales sobre el diagnóstico genómico en pediatría. 2015;86(1):3-11.
9. Guillén DMGJErdlfdcdls. Las enfermedades raras, un reto histórico. 2017(47):1-2.
10. González-Lamuño D, García Fuentes M, editors. Enfermedades de base genética. Anales del Sistema Sanitario de Navarra; 2008: SciELO Espana.
11. Silva CT, Contreras NC, Fonseca DJJAMC. Utilidad de la citogenética en la medicina actual. Visión histórica y aplicación. 2008;33(4):309-16.
12. Méndez Rosado LA, Nodarse Rodríguez A, Morales Rodríguez E, Barrios Martínez A, Soriano Torres M, Castelví López AJRCdOyG. Diagnóstico prenatal citogenético mediante la hibridación in situ con fluorescencia. 2012;38(1):1-10.
13. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. 2010;86(5):749-64.
14. Moeschler JB, Shevell MJP. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. 2006;117(6):2304-16.
15. Osorio VA, Guerrón LGG, Cheyne JARJRMU. Hibridación genómica comparativa: su interpretación y uso como herramienta diagnóstica en retardo mental inespecífico y síndromes de microdelección/microduplicación. 2016;29(2):11.
16. Coe BP, Lockwood WW, Chari R, Lam WL. Comparative genomic hybridization on BAC arrays. Microarray Analysis of the Physical Genome: Springer; 2009. p. 7-19.
17. Lee C, lafrate AJ, Brothman ARJNg. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. 2007;39(7s):S48.
18. Heather JM, Chain BJG. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. 2016;107(1):1-8.

19. Dovichi NJE. DNA sequencing by capillary electrophoresis. 1997;18(12-13):2393-9.
20. Bello Lemus Y. Asociación del polimorfismo FCGR2B-I232T con lupus eritematoso sistémico y nefritis lúpica en una población del Caribe colombiano. 2019.
21. Hert DG, Fredlake CP, Barron AEJE. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. 2008;29(23):4618-26.
22. Demkow U, Ploski R. Clinical applications for next-generation sequencing: Academic Press; 2015.
23. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi LJCI. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. 2013;340(2):284-95.
24. Mardis ERJTig. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. 2008;24(3):133-41.
25. Bautista RJEelB. Las tres generaciones de la secuenciación. 2010;3(128):4.
26. Metzker MLJNrg. Sequencing technologies—the next generation. 2010;11(1):31.
27. Martín IMDL, de Nanclares Leal GP. Nuevas tecnologías aplicadas en la detección de alteraciones genéticas. 2018.
28. Carroll C, Brilhante V, Suomalainen AJBjop. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. 2014;171(8):1837-53.
29. Ribate MP, Ramos FJJAdPC. Dismorfología clínica genética II: técnicas de diagnóstico molecular en los síndromes pediátricos. 2008;6(3):147-54.
30. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. 2015;17(5):405.
31. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. 2016;24(1):2.
32. Yska HA, Elsink K, Kuijpers TW, Frederix GW, van Gijn ME, van Montfrans JMJJoci. Diagnostic yield of next generation sequencing in genetically undiagnosed patients with primary immunodeficiencies: a systematic review. 2019;39(6):577-91.
33. de Trocóniz LLFJAmeep. Conceptos básicos para la solicitud e interpretación de estudios genético-moleculares en la clínica. 2015:15.
34. Tabarestani S, Ghaderian S, Rezvani HJAPJCP. Detection of gene amplification by multiplex ligation-dependent probe amplification in comparison with in situ hybridization and immunohistochemistry. 2015;16(17):7997-8002.
35. Llorente JL, Aldama P, Álvarez-Marcos C, Escudero J, Alonso-Guervós M, Fresno F, et al. Análisis genético molecular con MLPA en los adenocarcinomas nasosinusales. 2008;59(4):151-8.
36. Estrada-Juárez H, Fernández-Hernández L, Rivera-Pedroza C, Grether-González PJPyrh. MLPA (Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) en el diagnóstico perinatal rápido de las principales aneuploidías. 2012;26(3):172-9.
37. Vianna G, Medeiros P, Alves A, Silva T, Jehee FJGMR. Array-CGH analysis in patients with intellectual disability and/or congenital malformations in Brazil. 2016;15(1).
38. Cokyaman T, Silan FJF, Pathology P. Diagnostic Utility of Array Comparative Genomic Hybridization in Children with Neurological Diseases. 2020:1-9.
39. Baccarin M, Picinelli C, Tomaiuolo P, Castronovo P, Costa A, Verdecchia M, et al. Appropriateness of array-CGH in the ADHD clinics: A comparative study. 2020:e12651.
40. Lee C-L, Lee C-H, Chuang C-K, Chiu H-C, Chen Y-J, Chou C-L, et al. Array-CGH increased the diagnostic rate of developmental delay or intellectual disability in Taiwan. 2019;60(4):453-60.

41. Wayhelova M, Smetana J, Vallova V, Hladilkova E, Filkova H, Hanakova M, et al. The clinical benefit of array-based comparative genomic hybridization for detection of copy number variants in Czech children with intellectual disability and developmental delay. 2019;12(1):111.
42. Rochtus A, Olson HE, Smith L, Keith LG, El Achkar C, Taylor A, et al. Genetic diagnoses in epilepsy: The impact of dynamic exome analysis in a pediatric cohort. 2020;61(2):249-58.
43. Castellanos E, Rosas I, Negro A, Gel B, Alibés A, Baena N, et al. Mutational spectrum by phenotype: panel-based NGS testing of patients with clinical suspicion of RASopathy and children with multiple café-au-lait macules. 2020;97(2):264-75.
44. Castilla-Vallmanya L, Selmer KK, Dimartino C, Rabionet R, Blanco-Sánchez B, Yang S, et al. Phenotypic spectrum and transcriptomic profile associated with germline variants in TRAF7. 2020:1-12.
45. Lay-Son G, Espinoza K, Vial C, Rivera JC, Guzmán ML, Repetto GMJJdp. Chromosomal microarrays testing in children with developmental disabilities and congenital anomalies. 2015;91(2):189-95.
46. Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, Clark MM, Chowdhury S, Nahas S, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. 2018;3(1):1-8.
47. Petrikin JE, Cakici JA, Clark MM, Willig LK, Sweeney NM, Farrow EG, et al. The NSIGHT1-randomized controlled trial: rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants. 2018;3(1):1-11.

10. ANEXOS

10.1 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos se agruparon en una base de datos previamente diseñada, la cual contiene las variables necesarias (paciente, edad, sexo, natural, procedente, motivo de consulta, solicitud o no de cariotipo, examen molecular solicitado, resultados y hallazgos del examen, clasificación del resultado, diagnostico) que garantizaron la recolección completa y adecuada de los datos para el desarrollo de esta investigación. Ejemplo:

PACIENTE	EDAD	SEXO	NATURAL	PROCEDENTE	MOTIVO DE CONSULTA
1	23	FEMENINO	NEIVA	NEIVA	CÁNCER FAMILIAR
2	5	MASCULINO	FLORENCIA	FLORENCIA	TALLA BAJA
	CARIOTIPO	EXAMEN MOLECULAR	RESULTADOS	ANÁLISIS DE RESULTADO	DIAGNÓSTICO
1	NA	PANEL MOLECULAR	MUTACIÓN BRCA1	VARIANTE PATOGENICA	CÁNCER DE SENO
2	46,XY	SECUENCIACIÓN GEN NSD1	DELECIÓN 9.3MB GEN NSD1	VARIANTE PATOGENICA	SÍNDROME DE SOTOS

10.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se explicó a la totalidad de los pacientes o responsables legales de los mismos, los pro y contras de la participación de dicho estudio, no se sugestionó su participación, ni directa ni indirectamente, su firma fue de carácter obligatorio para avalar la participación dentro de la investigación, lo anterior se da constancia mediante el consentimiento informado anexo a continuación.

	FORMATO	
		FECHA DE EMISIÓN: ABRIL 2019
	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA	VERSIÓN: 02
		CÓDIGO: GDI-INV-F-001H
		PÁGINA:

Título del proyecto de investigación:	Importancia de aCGH y NGS en el diagnóstico etiológico de pacientes de genética
Nombre del investigador principal:	Henry Ostos Alfonso.
Sede donde se realiza el estudio:	Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo
Nombre del paciente:	Xxxxxxx

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

- 1. Objetivo del estudio** Identificar el rendimiento diagnóstico de las técnicas moleculares NGS y a-CGH.
- 2. Justificación del estudio** Brindar un diagnóstico definitivo y concreto de la enfermedad padecida.
- 3. Beneficios del estudio** Tras un diagnóstico claro, mejoraremos el enfoque y manejo terapéutico de cada paciente y se disminuirán drásticamente las secuelas originadas por estos trastornos, disminuirá la morbimortalidad de las diferentes patologías diagnosticadas, a través de la implementación de programas de planificación y prevención familiar, el Hospital fortalecerá su servicio de pediatría al contar con estas ayudas diagnósticas.
- 4. Procedimientos del estudio** Realizaremos una historia clínica o cuestionario médico donde indagaremos sobre sus antecedentes personales y familiares, a continuación, se le realizará un examen físico completo y exhaustivo, para poder determinar la pertinencia del examen molecular específico para cada caso particular.
- 5. Riesgos asociados al estudio** Este trabajo se considera una investigación sin riesgo, está amparada en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 referente a la investigación en seres humanos parágrafo A y B. Consiste en una investigación observacional y documental retrospectiva donde no realizaremos ningún tipo de intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaran en el estudio, además obedeciendo los estatutos, se respetará la dignidad y se protegerán los derechos a la privacidad y confidencialidad de la información obtenida durante la realización del examen físico, resultados de exámenes solicitados y de la información consignada en los archivos clínicos
- 6. Aclaraciones:** Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones de su

decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto económico alguno durante el estudio. No recibirá remuneración económica por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con el Doctor **Henry Ostos Alfonso** al teléfono **3006111288** y/o con el Doctor **Pablo Andrés Robayo Gómez** al teléfono **3173777438**. Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar el consentimiento informado que forma parte de este documento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, identificado con cédula de ciudadanía número _____ expedida en la ciudad de _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido contestadas de manera satisfactoria por el investigador que me entrevistó. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo tanto, deseo participar voluntariamente en el proyecto de investigación.

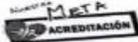
Nombres y Apellidos del Participante

Firma del Participante
C.C

Nombre del Testigo

Firma del Testigo
C.C

10.3 ACTA DE APROBACIÓN DE COMITÉ DE ÉTICA

	FORMATO	
		FECHA DE EMISIÓN: MARZO 2018
ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA E INVESTIGACIÓN		VERSIÓN: 01
		CÓDIGO: GDI-INV-F-001A
		PÁGINA: 1 de 12

ACTA DE APROBACIÓN N° 012-001

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 17 de Diciembre del 2019.

Nombre completo del Proyecto: "IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN Y LA HIBRIDACIÓN GENOMICA COMPARATIVA – ARRAY EN EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE PACIENTES QUE ACUDEN A CONSULTA MÉDICA DE GENÉTICA".

Enmienda revisada: Ninguna.

Sometido por: Investigador Henry Ostos Alfonso y Co-investigador Pablo Andrés Robayo Gómez.

El Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo constituyó mediante la Resolución N° 0784 del 07 de Junio de 2019 el Comité de Ética, Bioética e Investigación dando cumplimiento a la Resoluciones 8430 de 1993 y 2378 del 2008, actos administrativos expedidos por el Ministerio de la Protección Social, lo mismo que para obedecer lo dispuesto por la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la UNESCO.

El Comité de Ética, Bioética e Investigación certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto.
 - a. Resumen del proyecto.
 - b. Protocolo de Investigación.
 - c. Formato de Consentimiento Informado.
 - d. Protocolo de Evento Adverso.
 - e. Formato de recolección de datos.
 - f. Folleto del Investigador (si aplica).
 - g. Resultado de evaluación por otros comités (si aplica).
 - h. Acuerdo de Confidencialidad para Investigadores.
2. El Comité consideró que el presente estudio: es válido desde el punto de vista ético, la investigación se considera sin riesgo para las personas que participan. La investigación se ajusta a los estándares de buenas prácticas clínicas.
3. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos del estudio son las adecuadas.

	FORMATO	 FECHA DE EMISIÓN: MARZO 2018
		ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA E INVESTIGACIÓN VERSIÓN: 01 CÓDIGO: GDI-INV-F-001A PÁGINA: 2 de 12

4. El comité puede ser convocado por solicitud de alguno de los miembros que lo conforman o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
5. El investigador principal deberá:
 - a. Informar cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto, estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del comité de ética bioética e investigación de la Institución excepto cuando sea necesario que comprometa la vida del participante del estudio.
 - b. Avisar cualquier situación imprevista que considere que implica riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
 - c. Poner en conocimiento al Comité de toda información nueva, importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo / beneficio de los sujetos participantes.
 - d. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
 - e. Comprometerse a realizar una retroalimentación en el servicio donde se efectuó la investigación para presentar los resultados del estudio una vez finalizado el proyecto.
 - f. Realizar el informe final de la investigación el cual se debe entregar al Comité en un plazo máximo de un mes después de terminada la investigación.
 - g. Presentar un informe anual del proyecto si el tiempo para su desarrollo es superior a un año.
 - h. Comprometerse con hacer entrega de un artículo publicado en una revista indexada, refiriendo al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo como entidad participante y patrocinadora de la investigación.
 - i. Informar de manera escrita al Comité de Ética, Bioética e Investigación del Hospital Universitario H.M.P si el proyecto avalado va a participar en un evento académico.

Entiendo y acepto las condiciones anteriormente mencionadas por el Comité de Ética, Bioética e Investigación.

Nombre del Investigador: Henry Ostos Alfonso.



**Firma Presidente Comité de Ética,
Bioética e Investigación**