

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y CRIBADO GENÉTICO

NICOLÁS ENRIQUE FORERO CASTRO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

AGOSTO DE 2017

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y CRIBADO GENÉTICO

NICOLÁS ENRIQUE FORERO CASTRO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de

MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

CARLOS MARTÍN RESTREPO FERNÁNDEZ, MD, PhD

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRIA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

AGOSTO DE 2017

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

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

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y CRIBADO GENÉTICO

NICOLÁS ENRIQUE FORERO CASTRO

APROBADO

CARLOS MARTÍN RESTREPO FERNÁNDEZ, MD, PhD

DIRECTOR

JURADO

JURADO

Dedicado a Erlinda, Juliana y Héctor por su incansable apoyo, cariño y comprensión durante estos años de formación, a mis profesores por sus enseñanzas, al Doctor Carlos Restrepo por su paciencia durante la realización de este proyecto, a Ana María por traer una nueva ilusión y a Tin por estar siempre a mi lado.

LISTA DE CONTRIBUCIONES

Alfredo Uribe, Universidad de los Andes, Bogotá.

Ana Isabel Gómez, Universidad del Rosario, Bogotá.

Andrea Peña, CEMAF, Ibagué.

Carlos Estrada, COLCAN, Bogotá.

Claudia Serrano, Genetix, Bogotá.

Claudia Silva, Universidad del Rosario, Bogotá.

Clemencia Sabogal, Fundación Gillow, Bogotá.

Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá.

Jackeline Agudelo, Universidad del Tolima, Ibagué.

Juan Javier López, Colsanitas, Bogotá.

Juliana Vargas Osorio, INNN Manuel Velasco, Ciudad de México, México.

Julio Manzitti, Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina.

Luz Myriam Siza, Genética Molecular de Colombia, Bogotá.

Marc Boada, L`Studiolo de Pendulum, Valencia, España.

Nara García Quintero, Hospital General de México, Ciudad de México, México.

Nora Contreras, Universidad del Rosario, Bogotá.

Orlando Gualdrón López, Colsanitas, Bogotá.

Paul Laissue, CIGGUR, Bogotá.

Rodrigo Santamaría, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

INTRODUCCION

El diagnóstico de una patología de origen genético es útil para identificar el origen de la enfermedad, en algunos casos sirve para establecer el pronóstico o el tratamiento del paciente y frecuentemente permite establecer si hay o no algún riesgo de padecer un problema genético, junto con la recurrencia del mismo dentro del grupo familiar y el asesoramiento genético. Solicitar una prueba de diagnóstico genético representa un reto para el médico tratante cuando tiene que elegir cuál o cuáles son las pruebas genéticas más adecuadas para la persona a quien atiende. A través de la historia se han desarrollado diversos métodos y pruebas de laboratorio que surgieron como respuesta a las teorías (*“conjunto organizado de ideas que explican un fenómeno, deducidas a partir de la observación, axiomas, postulados, experiencia o el razonamiento lógico”*) (Wacker, 1998) que pretenden explicar las causas de los padecimientos de tipo genético y permitir al clínico la elección de las pruebas genéticas más idóneas para cada caso.

A principios del siglo XX, bajo el paradigma mendeliano, una de las teorías en boga estaba enfocada en reconocer las formas de transmisión de los caracteres hereditarios y establecer los patrones de herencia para algunos padecimientos; este paradigma mendeliano ha sido fructífero para la genética médica y resulta en una oferta de más de varios miles de opciones de diagnóstico genético de padecimientos solo de tipo monogénico o mendeliano. También en el siglo XX, particularmente en la segunda mitad, se identificaron patrones de signos y síntomas a través de los cuales se discriminaron miles de entidades nosológicas o sindrómicas de tipo genético y se constituyó la llamada era de la dismorfología, con la identificación y descripción de la mayoría de entidades que hoy conocemos en genética.

Muchos genetistas de la época y aún los de hoy, identifican las características presentes en un órgano o sistema (como la atresia de los conductos deferentes), o también agrupan patologías como opciones diagnósticas a través de un órgano o sistema (desórdenes esqueléticos o del tejido conectivo) que muestra una disfunción para poder llegar a proponer un posible diagnóstico. Otros genetistas usan la estrategia de identificar un “signo o síntoma pivote” que le pueda conducir a una hipótesis de diagnóstico (como los síndromes del dedo pulgar ancho o los que cursan con microtia). Otros llegan al diagnóstico identificando patrones de herencia (autosómico dominante o recesivo o ligado al sexo) para reducir el número de opciones de diagnóstico y lo combinan con los métodos anteriores con el mismo fin.

No obstante lo anterior y en muchos casos, no existe un modo de herencia, ni un conjunto específico de signos o síntomas que sumen en un diagnóstico evidenciable, ni un órgano o sistema específicamente alterado o no hay un signo o síntoma pivote, por lo que el caso de nuestro paciente puede quedar en un limbo clínico y lo que algunos colegas han llamado el “síndrome de escritorio”, en donde, por la ausencia de evidencia que nos informe cuál es la causa o el origen de su padecimiento, no se logra un diagnóstico, ni establecer un pronóstico y tratamiento o medios de prevención para nuestro paciente y su familia. En todos estos casos se requiere una prueba de diagnóstico genético.

Siguiendo una línea de tiempo, los primeros métodos de diagnóstico genético fueron aquellos basados en análisis bioquímicos y al microscopio. Los primeros, los análisis bioquímicos, estuvieron enfocados en la identificación de un metabolito anormal o ausente, tales como los grupos sanguíneos o cambios en el color, en el aspecto o de las propiedades de algún fluido corporal; mientras que el segundo, el microscopio, estaba dirigido a observar las alteraciones de las células como frecuentemente lo hacen los patólogos al describirnos las propiedades de una célula o de un tejido como es el caso de los tumores. En genética, luego de alcanzar el desarrollo de poder cultivar

en el laboratorio distintos tipos de células, fue posible ver el material genético bajo el microscopio a través de los cromosomas y se identificaron los primeros tipos de alteraciones cromosómicas, tanto constitucionales como el síndrome Down, como somáticas como el cromosoma Philadelphia presente en algunos tipos de leucemia. Con este avance surgió la citogenética y con ella la explicación de muchas condiciones humanas, incluso casos de aborto espontáneo o recurrente; sin embargo, a pesar de la citogenética, muchos otros padecimientos genéticos permanecieron sin explicación, con lo cual fue necesario pensar en alternativas que permitieran un análisis más minucioso del material genético.

Con los años 80s del siglo XX fueron posibles los métodos de biología molecular y se comenzaron a identificar alteraciones que escapaban al escrutinio de lo visible a través del microscopio, abriéndose una nueva frontera en el diagnóstico genético, que fue denominada genética molecular y que permitió identificar cambios a nivel estructural en el ADN, como por ejemplo deleciones o duplicaciones de uno o más nucleótidos de un gen y también alteraciones de la secuencia normal del ADN, las cuales alteran su expresión.

Los tres métodos: el método bioquímico, la citogenética (usando el microscopio) y la genética molecular, hicieron posible identificar la causa de numerosas enfermedades de etiología genética, principalmente monogénicas y cromosómicas; pero aún permanecían muchas otras entidades sin ser explicadas, particularmente los padecimientos oligogénicos, poligénicos, multifactoriales (complejos) y epigenéticos, que pueden incluso ser más comunes que los ya identificados hasta entonces.

Actualmente los métodos de diagnóstico genético se han ampliado más allá de lo previamente citado e involucran desarrollos de la citogenética como: distintos tipos de bandeo cromosómico, el cariotipo de alta resolución, el intercambio de cromátidas hermanas (CHI), los estudios de fragilidad

cromosómica y clastogénesis (sustancias que rompen y alteran el ADN), la hibridación fluorescente *In Situ* (FISH) o los híbridos de células somáticas.

Volviendo al principio, el análisis bioquímico se hizo más complejo y sofisticado, incluyendo la posibilidad de identificar los productos finales o intermedios de un proceso químico, electrolitos, hormonas, marcadores tumorales, proteínas anormales, enzimas disfuncionales y un largo etcétera de opciones para el diagnóstico genético.

De la misma forma, el análisis molecular involucra hoy el análisis de la molécula de ADN y ARN para regiones específicas o completas del genoma o transcriptoma (resultante de la transcripción del ADN a ARN), incluso de muchos genes relacionados con un grupo de alteraciones específicas (como los desórdenes del tejido conectivo o la epilepsia), o también el análisis del exoma completo (22 mil genes y 51 megabases), y pronto del genoma completo. Hoy se pueden identificar deleciones o duplicaciones al interior de un gen a través del método de ligación múltiple dependiente de amplificaciones (MLPA) o identificar amplias deleciones o duplicaciones de cualquier región del genoma a través de un microarreglo de hibridación genómica comparativa (aCGH). Actualmente se avanza en el estudio de las modificaciones epigenéticas que sufre el ADN a través de metilaciones, acetilaciones, microARNs y otros factores que modifican la expresión del material genético.

Todos estos tipos de pruebas están orientados a la identificación de personas en riesgo genético (cribado) o para establecer un diagnóstico genético; sin embargo, se requieren habilidades por parte del clínico para elegir las pruebas genéticas adecuadas para cada caso y el presente texto pretende acercarle al lector algunas de las pruebas más frecuentemente utilizadas en el cribado o en el diagnóstico de enfermedades de origen genético, haciendo énfasis en el origen de estos métodos,

su evolución, los niveles de precisión, los requerimientos legales, así como los requerimientos éticos necesarios en las pruebas de tipo genético.

CONTENIDO

1. HISTORIA.....	1
1.1 Teorías antiguas	1
1.2 La propuesta de Mendel	3
1.3 Reconociendo factores heredables en el humano	4
1.4 Reconociendo el ADN como molécula de la herencia	5
1.5 Relacionando el ADN con enfermedades en humanos.....	7
1.6 Primeros métodos de diagnóstico genético.....	9
1.7 Pruebas de diagnóstico molecular.....	11
1.8 Pruebas moleculares en el siglo XXI.....	13
1.9 Conclusión.....	14
2. PRUEBAS CITOGENETICAS	18
2.1. Introducción.....	18
2.2 Historia de la citogenética.....	19
2.3. El cariotipo	27
2.3.1. Cariotipo convencional.....	27
2.3.2 Cariotipo de alta resolución	29
2.4. Métodos de tinción para bandeamiento	30
2.4.1. Bandas Q.....	30
2.4.2 Bandas G.....	31
2.4.3 Bandas R.....	32
2.4.4 Bandas C.....	32

2.4.5 Bandas NOR	33
2.5. Características de los cromosomas.....	34
2.6. Análisis de los cromosomas...	36
2.7 Análisis de número y estructura de los cromosomas...	36
2.8. Cariotipo normal.....	37
2.9. Características cromosómicas variables normales	39
2.10. Cariotipo anormal	41
2.10.1 Anormalidades numéricas	41
2.10.2 Anormalidades estructurales.....	43
2.11. Situaciones especiales con el cariotipo.....	50
2.12. Variantes del cariotipo.....	53
2.12.1. Cariotipo espectral <i>Spectral Karyotyping (SKY)</i>	53
2.13. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia <i>Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)</i>	54
2.13.1. Análisis convencional.....	65
2.13.2. Análisis de células en metafase por FISH	65
2.13.3. Análisis de células en interfase por FISH.....	66
2.13.4. Modificaciones de la técnica de FISH.....	67
2.13.4.1 Multiplex-FISH	67
2.13.4.2 Fiber-FISH.....	68
2.13.4.3 Flow-FISH	68
2.13.5 Limitaciones de la FISH.....	68
2.14. Análisis de microarreglos cromosómicos...	69
2.15. Conclusión	72

3. PRUEBAS GENÉTICAS Y GENÓMICAS.....	74
3.1 Secuenciación del ADN	75
3.1.1 Pirosecuenciación	76
3.1.2 Secuenciación de siguiente generación (<i>Next Generation Sequence –NGS-</i>).....	78
3.1.2.1 Secuenciación de genoma completo (<i>Whole genome sequence –WGS-</i>)	81
3.1.2.2 Secuenciación de exoma completo (<i>Whole exome sequence –WES-</i>).....	83
3.1.2.3 Indicaciones de secuenciación de siguiente generación para la realización de una prueba diagnóstica o de cribado.....	84
3.2 Paneles multigenes.....	86
3.3 Pruebas de farmacogenética	94
3.4 Biomarcadores.....	102
3.4.1 Biomarcadores de ADN	104
3.4.2 Biomarcadores de ARN	105
3.4.3 Biomarcadores epigenéticos.....	107
3.5 conclusión.....	109
4. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN HUMANA.....	112
4.1 Sistema de grupos sanguíneos y factor Rh....	112
4.2 Proteínas séricas.....	113
4.3 Polimorfismos cromosómicos.....	114
4.4 Antígeno leucocitario humano <i>Human Leucocyte Antigen (HLA)</i>	115
4.5 <i>Fingerprinting</i>	118
4.6 Repeticiones cortas en tándem <i>Short Tandem Repeats (STRs)</i>	118
4.7 Determinación del sexo	123

4.7.1 Cromosoma X.....	123
4.7.2 Cromosoma Y.....	124
4.7.3 AMEL X, AMEL Y.....	125
4.8 ADN mitocondrial (mitADN).....	126
4.9 Polimorfismos de nucleótido único – <i>Single Nucleotide Polimorphysm (SNP)</i>	127
4.10 Pruebas de filiación.....	127
4.10.1 Cálculos matemáticos en pruebas de filiación	134
4.10.2 Informe del resultado de la prueba de filiación	139
4.10.3 Casos complejos en filiación	141
4.11. Conclusión.....	141
5. PRUEBAS DE CRIBADO	143
5.1 Generalidades.....	143
5.2 Aplicación de las pruebas de cribado	145
5.3 Tipos de pruebas de cribado	145
5.4 Primeras pruebas de cribado en genética.....	147
5.5 Pruebas de cribado en genética	148
5.5.1 Cribado de errores innatos del metabolismo.....	148
5.5.2 Cribado de defectos Endocrinológicos.....	159
5.5.3 Cribado de alteraciones anatómicas fetales	162
5.5.3.1 Ultrasonido y marcadores bioquímicos del primer y segundo trimestre.....	167
5.5.3.2 Pruebas Prenatales No Invasivas.....	169
5.5.4 Cribado de sorderas	179
5.5.5 Cribado de defectos oculares congénitos	182

5.5.6 Cribado de desórdenes hematológicos	184
5.5.6.1 Cribado de grupos sanguíneos...	185
5.5.7 Cribado del cáncer hereditario.....	187
5.5.8 Cribado de defectos congénitos pulmonares	191
5.5.9 Cribado preimplantacional.....	195
5.6 Cribado para grupos étnicos	198
5.7 Conclusión.....	203
6. BIOBANCOS Y BANCOS ADN/ARN	206
6.1 Tipos de biobancos	209
6.2 Legislación sobre biobancos	210
6.3 Ética en biobancos	212
6.4 Proceso de recolección, análisis y almacenamiento de una muestra	214
6.4.1 el consentimiento informado en los biobancos y bancos de ADN/ARN.....	214
6.4.2 Recolección de muestras para los biobancos y bancos de ADN/ARN	215
6.4.3 Extracción de ADN	217
6.4.4 Identificación de la muestra.....	218
6.4.5 Almacenamiento del ADN o la muestra biológica	219
6.5 Control de calidad en los biobancos y bancos de ADN/ARN.....	222
6.6 Biobancos a nivel mundial	223
6.7 Conclusión	225

7. BIOÉTICA EN LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y CRIBADO GENÉTICO.....	228
7.1 Introducción.....	228
7.2 Principios de la Bioética	229
7.3 Aplicación de los principios de Bioética.....	230
7.4 Consentimiento informado.....	231
7.4.1 Elementos de información en el consentimiento informado.....	232
7.5 Competencia para la firma del consentimiento informado.....	235
7.5.1 Consentimiento informado para menores de edad	236
7.5.2. Consentimiento informado para mayores de edad.....	237
7.6 Protección de los datos genéticos	239
7.7 Resultados de la prueba diagnóstica	241
7.7.1 Resultado positivo	241
7.7.2 Resultado negativo	242
7.7.3 Hallazgos indeterminados/incidentales o secundarios	242
7.8 Asesoría genética como medio de protección para el paciente.....	243
7.9 Etapas del asesoramiento genético.....	244
7.10 Retos luego de conocer el resultado de la prueba genética.....	244
7.10.1 El derecho de terceros.....	245
7.10.2 El derecho a decidir una vida reproductiva... ..	245
7.10.3 Reto sobre decisiones eugenésicas	245
7.11 Conclusión.....	246
8. FUTURO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN GENÉTICA.....	250
8.1 Microscopio de luz y pruebas citogenéticas.....	250

8.2 Pruebas imagenológicas...	252
8.3 Pruebas bioquímicas y sanguíneas.....	256
8.4 El análisis del ADN.....	257
8.5 Análisis de los mecanismos no genómicos que controlan la expresión génica (epigenética).....	259
8.6 Situación actual del diagnóstico en genética.....	260
8.7 Visión del diagnóstico genético	264
8.8 Conclusión	267
Anexos.....	270
Bibliografía.....	284

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Condiciones que requieren análisis citogenético especial.....	52
Tabla 2.2 Situaciones especiales en oncología.....	53
Tabla 2.3 Tipos de sondas para FISH utilizadas en el diagnóstico de deleciones, duplicaciones o fusiones cromosómicas... ..	56
Tabla 2.4 Lista de algunos de los fluorocromos más utilizados en FISH	57
Tabla 2.5 Algunos de los síndromes de microdeleciones o microduplicaciones cromosómica identificados por FISH.....	60
Tabla 2.6. Principales malignidades hematológicas diagnosticadas a través de FISH	61
Tabla 3.1. Porcentaje de cobertura en una secuenciación de acuerdo al valor de X... ..	79
Tabla 3.2. Plataformas de secuenciación	82
Tabla 3.3 Métodos de captura de exones	83
Tabla 3.4. Paneles multigenes para el análisis de defectos cardiacos congénitos.....	89
Tabla 3.5. Paneles multigenes para epilepsia	92
Tabla 3.6. Paneles multigenes para ataxias hereditarias	93
Tabla 3.7. Características fenotípicas de acuerdo con la tasa de metabolización de una persona.....	95
Tabla 3.8. Pruebas genéticas en farmacogenética.....	101

Tabla 3.9. Recursos en la red de internet.....	102
Tabla 3.10. Tipos de biomarcadores.....	103
Tabla 3.11. Aplicaciones de los biomarcadores de ADN	105
Tabla 3.12. Uso de biomarcadores ARN.....	107
Tabla 3.13. Algunos biomarcadores epigenéticos	109
Tabla 4.1 proteínas utilizadas en identificación humana.....	114
Tabla 4.2 Marcadores previstos por el CODIS para identificación humana.....	120
Tabla 4.3 Marcadores STRs disponibles en los diferentes estuches comerciales de identificación humana.....	122
Tabla 4.4 Marcadores STRs para el cromosoma X	124
Tabla 4.5 Marcadores STRs disponibles en estuches comerciales para el análisis del cromosoma Y.....	125
Tabla 4.6 Ejemplo de segregación de alelos	135
Tabla 5.1 Tipos y características del cribado	143
Tabla 5.2 Criterios para las pruebas de cribado	144
Tabla 5.3 Valores predictivos.....	145
Tabla 5.4 Errores innatos del metabolismo (EIM)...	148

Tabla 5.5 Pruebas de tubo para cribado de algunos EIM	150
Tabla 5.6 EIM cribados a través de espectrometría de masas.....	158
Tabla 5.7 Marcadores de tejidos blandos <i>soft markers</i>	165
Tabla 5.8 Tasa de detección de aneuploidías basados en edad materna, marcadores bioquímicos y ultrasonografía.....	168
Tabla 5.9 Marcadores moleculares utilizados en NIPT.....	175
Tabla 5.10 Estuches comerciales para NIPT	178
Tabla 5.11. Síndromes genéticos que cursan con pérdida auditiva	179
Tabla 5.12. Algunos de los Síndromes de cáncer heredofamiliar	189
Tabla 5.13. Paneles genéticos de utilidad en oncología	191
Tabla 5.14. Pruebas de cribado para fibrosis quística disponibles comercialmente.....	192
Tabla 5.15. Pruebas disponibles comercialmente para el cribado preimplantacional... ..	198
Tabla 5.16. Patologías cribadas de acuerdo a los grupos étnicos	199
Tabla 5.17. Patologías hereditarias susceptibles de cribado en población judía	202
Tabla 5.18. Paneles de cribado para patologías más frecuentes en judíos Askenazi.....	202
Tabla 5.19. Pruebas de cribado para mutaciones fundadoras en población judía Askenazi	203
Tabla 6.1 Biobancos para muestras de enfermedades de inicio en la edad adulta	208
Tabla 6.2 legislación sobre biobancos a nivel mundial	211

Tabla 6.3 Capacidad de extracción de ADN de los diferentes métodos 218

Tabla 7.1 Lista de chequeo del consentimiento informado..... 233

Tabla 7.2. Cobertura de los principios éticos por parte del consentimiento informado 238

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Evolución de la genética y las pruebas genéticas a través del tiempo	15
Figura 4.1 Nomenclatura utilizada en la tipificación del HLA	117
Figura 4.2 Organización del genoma Humano y localización de los STRs	119
Figura 4.3 Fórmula para determinar el índice de paternidad (IP).....	135
Figura 4.4 Fórmula para determinar el valor de Y.....	136
Figura 4.5 Fórmula para establecer la probabilidad de paternidad (W)...	137
Figura 4.6 Esquema del informe con resultados de la prueba de filiación	140
Figura 5.1 Método de enriquecimiento basado en formaldehído.....	172
Figura 6.1 Proceso de funcionamiento de un banco de ADN, desde que se toma la muestra hasta la retroalimentación de los resultados	222
Figura 6.2 Distribución mundial de biobancos y bancos de ADN	224

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.1. A. Microscopio del siglo XVIII, B. homúnculo preformado.....	2
Imagen 1.2. A. Resultado de las observaciones hechas por Mendel; B. teoría de la pangénesis propuesta por Darwin	3
Imagen 1.3. ADN visualizado por medio de la difracción de rayos X	6
Imagen 1.4. Cromosomas en porta objetos.....	8
Imagen 1.5. Trisomía 21 libre, Síndrome Down	9
Imagen 2.1. Cariotipo bandeado G. A. cariotipo de XX femenino. B. cariotipo XY hombre	20
Imagen 2.2. Clasificación cromosómica por grupos.....	22
Imagen 2.3. Alteraciones numéricas A. trisomía 21 síndrome Down, B. trisomía 18 síndrome Edwards, C. trisomía 13 síndrome Patau	22
Imagen 2.4. Cariotipo femenino 45,X síndrome Turner.....	23
Imagen 2.5. Cariotipo femenino 47,XXX síndrome triple X.....	24
Imagen 2.6. Cariotipo masculino con complemento cromosómico anormal 48,XXYY, correspondiente a una variante del síndrome Klinefelter	24
Imagen 2.7. Cariotipo convencional 550 bandas	28
Imagen 2.8. Cariotipo de alta resolución 750 bandas.....	29

Imagen 2.9. Cariotipo bandeamiento Q.....	30
Imagen 2.10. Cariotipo bandeamiento G... ..	31
Imagen 2.11 Cromosomas con bandeamiento C.....	33
Imagen 2.12 Cromosomas con bandeamiento NOR... ..	34
Imagen 2.13. Los tres tipos de cromosomas presentes en el humano	35
Imagen 2.14. Cariotipo 46,XX: cariotipo con un número normal de cromosomas que corresponde a una mujer	38
Imagen 2.15. Cariotipo 46,XY: cariotipo con un número normal de cromosomas que corresponde a un hombre.....	39
Imagen 2.16. Cariotipo con heteromorfismos... ..	40
Imagen 2.17. Anormalidad numérica trisomía 21.....	42
Imagen 2.18. Anormalidad numérica trisomía 18.....	42
Imagen 2.19. Cariotipo 46,XX,del(18)(q21.3).....	43
Imagen 2.20. Cariotipo 44,X,der(13:14)(q10;q10)	44
Imagen 2.21. Duplicación	45
Imagen 2.22. Inserción	45
Imagen 2.23. Inversión	46
Imagen 2.24. Cariotipo 46,XY, fra(16)(q22).....	47
Imagen 2.25. Cariotipo 46,XX,r(4)(p16q35)	48

Imagen 2.26. Cariotipo 46,XY,t(1;16)(p33;q24)	49
Imagen 2.27. A. microscopio óptico equipado con filtros para fluorescencia para la detección de sondas marcadas y B. filtro de protección contra luz ultravioleta.....	57
Imagen 2.28. Sondas sitio-específicas para identificación de los cromosomas 13, 18, 21, y los cromosomas sexuales X y Y... ..	58
Imagen 2.29. Nuc ish (D7Z1x2, ELNx1), prueba de FISH para delección en el cromosoma 7	60
Imagen 2.30. Nuc ish (EGR1, RPS14, 5p15), Prueba de FISH para delección 5q	61
Imagen 2.31. Nuc ish (ABL,BCR)x2[86/100]/(ABL1,BCR)x2(ABL1conBCR)x1[14/100]. Prueba de FISH BCR/ACL para translocación 9;22.....	62
Imagen 2.32. Prueba de FISH para translocación de los cromosomas 15;17.....	63
Imagen 2.33. Prueba de FISH para delección del gen <i>P53</i>	63
Imagen 2.34. Prueba de FISH para translocación 4;14.....	64
Imagen 2.35. Prueba de FISH para translocación 14;16.....	64
Imagen 2.36. Análisis por CGH del cromosoma X, a través de Cytoscan... ..	72
Imagen 3.1. Nivel de profundidad.....	80
Imagen 4.1. Ubicación de los <i>loci</i> analizados en el CODIS	121
Imagen 4.2. Prueba de filiación NO EXCLUSION de la paternidad	131

Imagen 4.3. Prueba de filiación binomio EXCLUSION de la paternidad	133
Imagen 4.4 Resultados del cálculo matemático A. NO EXCLUYE LA PATERNIDAD; B. EXCLUYE LA PATERNIDAD	138
Imagen 5.1. Resultados prueba de tubo de ensayo con nitroso naftol	151
Imagen 5.2. Resultados prueba de tubo de ensayo con dinitrofenilhidralazina.....	152
Imagen 5.3. Resultado prueba de tubo de ensayo con Nitro prusiato	153
Imagen 5.4. Resultado prueba de tubo de ensayo con Cloruro férrico	154
Imagen 5.5. Resultado prueba de tubo de ensayo con reactivo de Benedict.....	155
Imagen 5.6. Resultado prueba de tubo de ensayo con el reactivo Seliwanoff... ..	156
Imagen 5.7. Tarjeta FTA para cribado de hipotiroidismo congénito.....	161
Imagen 5.8. Evaluación del diámetro cefálico.....	162
Imagen 5.9. Ultrasonografía en tercera dimensión, gestación de 24 semanas... ..	164
Imagen 5.10. Translucencia nual. A. Curva de translucencia nual, B. Medición de la translucencia nual durante la exploración ultrasonográfica	166
Imagen 5.11. Evaluación por ultrasonografía del Ductus arterioso	166
Imagen 5.12. Evaluación simultanea de la osificación del hueso nasal y la translucencia nual.....	167
Imagen 5.13. Reporte del resultado del análisis de 2 marcadores bioquímicos β HCG y PAPP-A en una prueba de cribado en el primer trimestre para cromosomopatías	169

Imagen 5.14. Curva para calcular el riesgo de cromosopatías en el 1er trimestre de gestación, de acuerdo con la edad materna.....	169
Imagen 5.15. Método de enriquecimiento del ADN por medio de separación de fragmentos.....	173
Imagen 5.16. Fondo de ojo que permite evidenciar edema del nervio óptico en un paciente con síndrome Hurler	183
Imagen 5.17. Catarata en un paciente con galactosemia.....	184
Imagen 5.18. Electroforetogramas con la variante c.1521_1523delCTT heterocigota.....	193
Imagen 5.19. Electroforetogramas que indican el polimorfismo c.1408G>A (p.Val470Met) heterocigota/homocigota en el exón 11.....	194
Imagen 5.20. <i>CFTR</i> exón 14: c.1826A>G heterocigota (p.His609Arg)	194
Imagen 5.21. <i>CFTR</i> exón 19: c.3041A>G heterocigota (p.Tyr1014Cys)	195
Imagen 6.1 Contenedor de nitrógeno líquido.....	219
Imagen 6.2. Sistema de almacenamiento en congeladores con temperatura constante	220
Imagen 8.1. Microscopio óptico.....	251
Imagen 8.2. Visualización bajo microscopio óptico de un set de cromosomas... ..	252
Imagen 8.3. Ultrasonografía en dos dimensiones utilizada en las primeras etapas de cribado neonatal	253
Imagen 8.4. RMN que permite visualizar la presencia varios tubérculos corticales.....	254

Imagen 8.5. Tubérculo subependimario RMN	255
Imagen 8.6. RMN que muestra imagen de doble corteza.....	255
Imagen 8.7. Termociclador.....	258
Imagen 8.8. Muestra las interacciones presentes entre un grupo de genes.....	262
Imagen 8.9. Posible nuevo enfoque para el diagnóstico de patologías genéticas.....	266

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Reporte de los resultados del análisis realizado para el síndrome de Usher a través de un panel multigenes.....	270
Anexo 2. Resultado del analisis de un panel de 15 genes para cancer de mama/ovario	274
Anexo 3. Reporte de los resultados de un Exoma completo 23 mil genes	278

1. HISTORIA

La identificación de los procesos y factores implicados en la transmisión de las características hereditarias es el resultado del desarrollo de un par de teorías propuestas en la historia reciente y que permitieron que emergiera la genética como una ciencia. Los paradigmas de Mendel y Galton, sobre la herencia de las características monogénicas y de las características complejas, respectivamente. Ambas teorías han ofrecido la explicación a miles de fenómenos y padecimientos humanos.

Actualmente, lo que hoy conocemos por Genética Médica es el resultado del trabajo de decenas de miles de investigadores que han dado respuesta a muchos interrogantes derivados de estas dos teorías. Los métodos diagnósticos disponibles hoy son diversos y sofisticados. En los siguientes párrafos se hará un recuento cronológico de los principales eventos en este proceso, así como los descubrimientos y avances en las pruebas de diagnóstico genético para el entendimiento de la enfermedad humana.

1.1. Teorías antiguas

A lo largo de la historia se han propuesto teorías para dilucidar y entender cómo se transmiten las características heredables y reconocer la participación del ambiente en el fenotipo. Hipócrates (siglo V a.c.), propuso que la herencia se basaba en la producción y transmisión de partículas a la descendencia (Y. Liu & Li, 2016). Un siglo más tarde, Aristóteles presentó controversia al afirmar que la mezcla entre el semen masculino y femenino (catamenia), era el origen de todas las partes del cuerpo de un individuo (Trompoukis, Kalaitzis, Giannakopoulos, Sofikitis, & Touloupidis, 2007). Esta última teoría prevaleció hasta mediados del siglo XVIII, cuando Jean-Baptiste Lamarck, apoyado en

el novedoso aparato de investigación biológica de la época, el microscopio, postulo la existencia de un humano preformado (homúnculo) en cada espermatozoide y que éste era depositado en la mujer para su crecimiento. Una importante contribución a la explicación del proceso de la herencia fue la realizada por Joseph Adams, a comienzos del siglo XVIII, quien propuso los conceptos sobre trasmisión de los rasgos hereditarios y la prevención de enfermedades hereditarias. En el libro publicado en 1814 *“un tratado sobre las supuestas propiedades hereditarias de las enfermedades”*, hace la distinción entre rasgos familiares y hereditarios, indicando que los rasgos familiares son los que están presentes en una sola generación, mientras que los rasgos hereditarios trascienden varias generaciones, así mismo, postuló que los desórdenes congénitos se presentan más como rasgos familiares (recesivos) que como rasgos hereditarios (dominantes), siendo los primeros más graves y pudiendo conducir a la muerte a una temprana edad (Emery, 1989).



Imagen 1.1. **A.** microscopio del siglo XVIII, a través de uno similar Lamarck realizo las observaciones de espermatozoides que le permitieron postular su teoría de la herencia de características, **B.** homúnculo preformado, como forma de transmisión de la herencia en los humanos. Modificado de (Garrido Garrido & Barcía González, 2011). Imagen **A** réplica del microscopio de Leeuwenhoek, fabricado por Marc Boada, gentilmente cedida por L`Studiolo de Pendulum (www.pendulum.es).

1.2 La propuesta de Mendel

A mediados del siglo XIX, el monje austriaco Gregor Mendel sentó las bases de la genética al publicar el trabajo “*experimentos sobre hibridación de plantas*”, en el cual plasmó la teoría sobre el mecanismo fundamental de la herencia (Westerlund & Fairbanks, 2010). Al mismo tiempo el naturalista Charles Darwin, planteo “*la hipótesis provisional de la pangénesis*” en un manuscrito, como un intento por explicar los mecanismos hereditarios. En esta teoría, Darwin asumió la presencia de partículas circulantes en el cuerpo las cuales denomino “*gémulas*” que provenían de las células somáticas; estas gémulas presentaban un estado inactivo, eran mutuamente afines y se agrupaban formando unidades sexuales que eran transmitidas de los progenitores a la descendencia (Geison, 1969). En el año 1900, de forma simultánea e independiente, tres agrónomos europeos: Hugo deVries, Carl Correns y Erich von Tschermak-Seysenegg, validaron y publicaron resultados similares a los de Mendel (Simunek, Hossfeld, & Wissemann, 2011). Luego fue William Bateson quien atribuyó estos hallazgos como las Leyes de Mendel y acuñó el término Genética para la ciencia que estudia las leyes de la herencia y la variación.

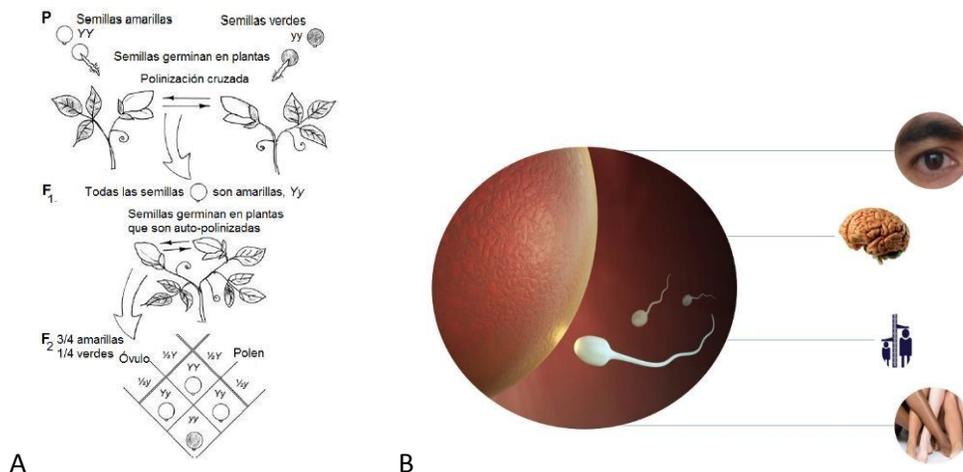


Imagen 1.2. **A.** resultado de las observaciones hechas por Mendel; **B.** teoría de la pangénesis propuesta por Darwin. Modificado de (Piro, 2012).

De la misma forma que las leyes de Mendel se aplicaban a las plantas, también se observó que estas leyes aplicaban para algunas enfermedades humanas, como fue observado por A. Garrod, durante la primera década del siglo XX. Garrod realizó seguimiento a un grupo de pacientes con alcaptonuria y luego de revisar las observaciones hechas por otros colegas, destacó la capacidad de los hijos de parejas consanguíneas de desarrollar ciertas enfermedades, para las cuales se encontró un patrón de herencia recesivo (Garrod, Oxon, & Lond, 1996). En esta misma década el norteamericano W. Sutton, durante sus estudios en saltamontes, observó la agrupación de los cromosomas en parejas y su posterior segregación durante la meiosis, con lo cual declaró *“la probabilidad que la asociación de los cromosomas maternos y paternos en pares y la subsecuente separación durante la división reduccional, puede constituir la base física de las leyes mendelianas de la herencia”* (Crow & Crow, 2002).

1.3 Reconociendo factores heredables en el humano

De la misma forma que fueron elucidadas algunas enfermedades con herencia recesiva, otras con herencia dominante salieron a la luz, como es el caso de la braquidactilia tipo A1, entidad estudiada por William Farabee, quien describió en su tesis doctoral una gran familia de los Estados Unidos, con dedos cortos y transmisión con herencia dominante que afectaba varias generaciones (McCready, Grimsey, Styer, Nikkel, & Bulman, 2007). Otros ejemplos que confirmaron la aplicación de las leyes de Mendel en rasgos hereditarios humanos fueron los grupos sanguíneos. El grupo ABO fue descrito en 1901 por K. Landsteiner y en 1902, von Decastello y Struli identificaron el fenotipo codominante AB, cuya naturaleza hereditaria se evidenció en 1923 con el trabajo de von Dungern y Hirschfeld; ellos demostraron en 72 familias, que los alelos dominantes eran los grupos A y B, el

recesivo era el alelo O y el grupo ABO se heredaba de acuerdo con las leyes de Mendel, por lo que podía ser usado en investigaciones forenses (Geserick & Wirth, 2012).

1.4 Reconociendo el ADN como molécula de la herencia

En la segunda década del siglo XX, H. Muller publicó observaciones sobre los efectos de los rayos X en la producción de mutaciones ligadas al cromosoma sexual en las moscas de la fruta (Muller, 1927). Estableció la relación entre lesiones en los cromosomas con alteraciones del fenotipo y la inducción de enfermedades genéticas. En la década de 1930, J.B.S. Haldane presentó un método indirecto para estimar la tasa de mutación en una enfermedad ligada al sexo, este cálculo asumía equilibrio entre la selección y la mutación (Oldenburg et al., 1993).

Pasaron muchos años para determinar qué tipo de molécula era la encargada de la transmisión de las características hereditarias. Solo a través de un evento fortuito, el microbiólogo británico Frederick Griffith identificó la primera evidencia que el ADN era el principio transformante de la virulencia de una bacteria, al intentar desarrollar una vacuna para la prevención de la neumonía; utilizó dos cepas de *Streptococcus pneumonia* (una virulenta y otra no), que fueron inoculadas en ratones, con el resultado de la muerte del ratón que había sido inoculado con la cepa virulenta; luego de la cepa virulenta era desnaturalizada por calor y junto con la cepa no virulenta eran inoculada en los ratones, estos se infectaban y morían como resultado inesperado. Se concluyó que el factor transformante presente en la sepa virulenta inactiva era capaz de ofrecer propiedades virulentas a la cepa no virulenta y convertirla en un agente infeccioso mortal (Vasil, 2008).

En 1952 Hershey y Chase utilizaron fagos marcados radioactivamente con azufre y fósforo, con el fin de hacer visibles las proteínas y el ADN respectivamente. Los fagos se pusieron en contacto con bacterias *Escherichia coli* para infectarlas, e identificaron que durante el proceso de infección las

proteínas permanecían en la periferia de la célula y solamente el ADN del fago era capaz de ingresar a la célula. Además, encontraron que el fósforo y la adenina derivados de la partícula infectante, eran transferidos a la progenie del fago, por lo cual concluyeron: *“nosotros inferimos que las proteínas que contienen azufre no tiene ninguna función en la multiplicación del fago y que el ADN tiene alguna función”* (Hershey & Chase, 1952).

Habiendo encontrado una prueba de la participación del ADN como material hereditario, comenzó el interés por el estudio de esta molécula con el uso de diferentes métodos de análisis, Rosalind Franklin obtuvo una imagen de la estructura del ADN mediante la difracción de rayos X en 1953, describiéndolo como una estructura de dos cadenas; ella y Wilkins tenían datos experimentales para proponer que el ADN tenía forma helicoidal con un esqueleto de azúcar y fosfatos en el exterior y las bases nitrogenadas localizadas en el interior de la molécula (Pardo, 2004).

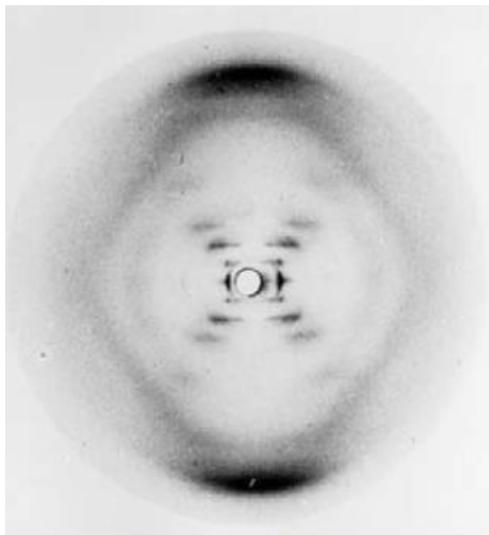


Imagen 1.3. ADN visualizado por medio de la difracción de rayos X, mostrando las bases nitrogenadas en el centro y los esqueletos de azúcar en la periferia. Tomado de (Piro, 2012).

No obstante fueron James Watson y Francis Crick quienes develaron la estructura correcta del ADN. Crick había desarrollado una teoría para explicar la estructura helicoidal de las proteínas con base en las imágenes de difracción de los rayos X, que fue la base para determinar el número de cadenas polinucleotídicas del ADN, para las cuales no se había logrado un consenso; mientras Watson, apoyado por Wilkins, logró tener acceso a las imágenes cristalográficas del ADN y propuso una nueva visión de la estructura del mismo. Basados en las reglas de Chargaff, Watson y Crick establecieron el orden de apareamiento de las bases nitrogenadas, y de esta forma en marzo de 1953, terminaron un modelo metálico de la molécula de ADN conforme con los hallazgos de la doctora Franklin (Pardo, 2004).

1.5 Relacionando el ADN con enfermedades en humanos

Identificado el ADN como material de la herencia, se intensificó el estudio en los cromosomas. Un primer paso fue la determinación del número preciso en los humanos, en 1956 Tjio y Levan, quienes estudiaron cultivos de tejidos de embriones humanos y luego de contar 265 mitosis, hallaron una cifra constante de 46 cromosomas (Tjio, 1978).

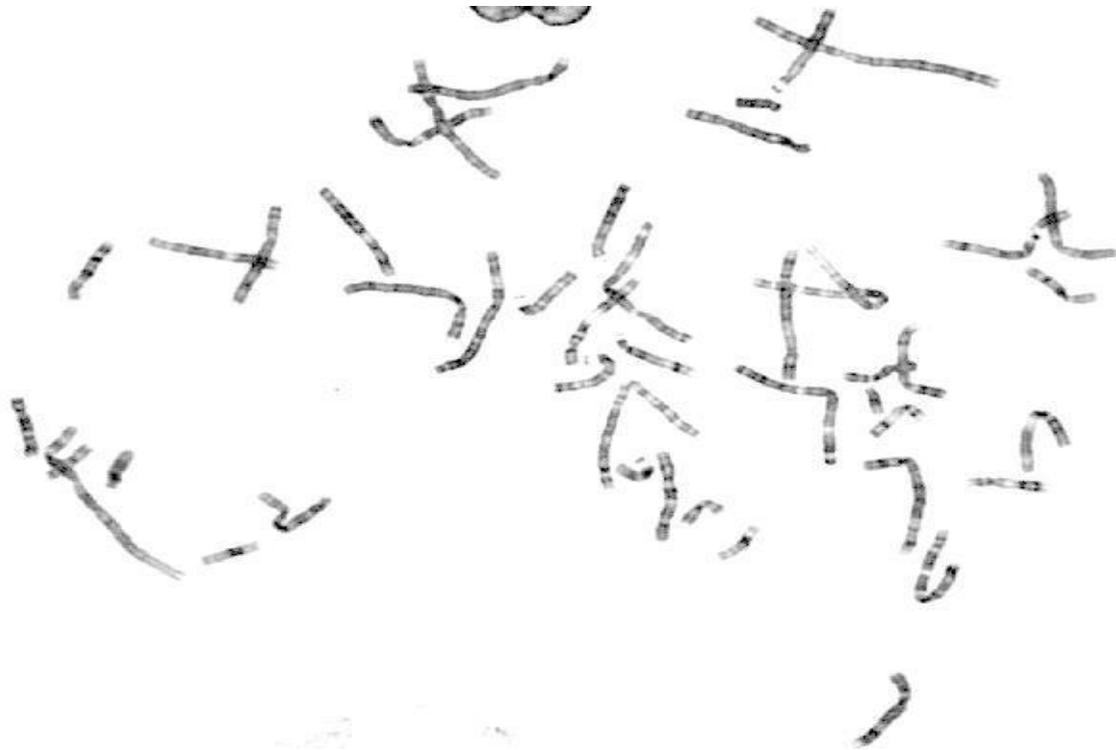


Imagen 1.4. Cromosomas en porta objetos. Cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá Colombia.

Con el análisis del número de cromosomas, se inició la identificación de las anomalías en el número de los cromosomas y la etiología de estas como causa de enfermedades congénitas. Con la introducción de una solución hipotónica en la técnica del cariotipo, el genetista Lejeune en 1959, identificó la causa del síndrome Down por la presencia de un cromosoma 21 extra (Megarbane et al., 2009); subsecuentemente se reportaron las trisomías 13 y 18, además de la monosomía del cromosoma X.

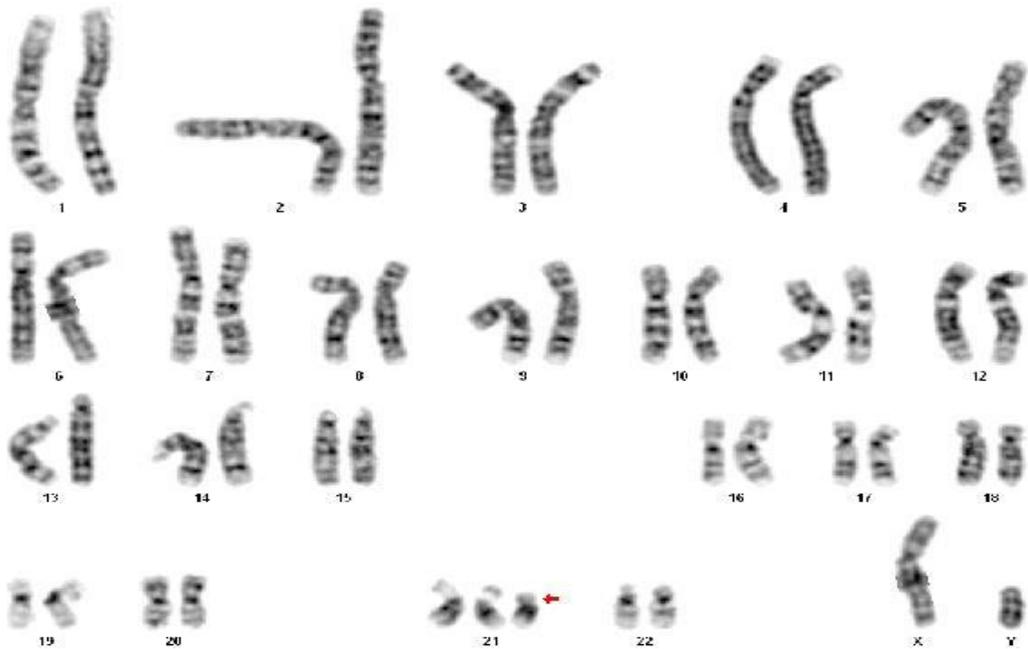


Imagen 1.5. Trisomía 21 libre, Síndrome Down, cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá, Colombia.

A partir de estos descubrimientos y su probable asociación con la edad materna, se establecieron estrategias para la detección de anomalías cromosómicas durante el periodo prenatal, como lo fue la amniocentesis con realización de cariotipo (Etzioni, Britain, & Milunsky, 1976).

1.6 Primeros métodos de diagnóstico genético

Mediante la coloración fluorescente con Quinacrina, Caspersson y colaboradores, lograron evidenciar el bandeamiento de los cromosomas y la identificación precisa de cada par (Caspersson, Zech, & Johansson, 1970), dando origen a las bandas Q (QTQ). Luego se desarrollaron las bandas G (GTG), mediante la digestión con tripsina y la coloración con Giemsa, con lo cual se evitaba el uso de microscopia de fluorescencia (M. E. Drets & Shaw, 1971). Se abrió entonces una puerta para la

identificación precisa de anomalías estructurales de los cromosomas (síndrome Cri du Chat y síndrome Wolff, por la delección del brazo corto de un cromosoma del grupo B).

Otros métodos de análisis citogenético como la alta resolución, el estudio de fragilidades cromosómicas, entre otros (Anemia de Fanconi, síndrome Bloom, ICH) aparecieron en años siguientes, así como el diagnóstico prenatal por amniocentesis, biopsia de vellosidad corial o sangre fetal.

En 1971 se desarrolló un nuevo método para el estudio del ADN mediante el uso de las enzimas de restricción para la identificación de la Anemia Falciforme (Danna & Nathans, 1971). Poco después, Sanger y Coulson describieron un método rápido y simple que hizo posible la secuenciación del genoma de un bacteriófago, con el uso de una polimerasa de ADN para copiar regiones específicas bajo condiciones controladas (Sanger & Nicklen, 1977).

La principal limitación del método Sanger era la baja cantidad de material copiado disponible, debido a la desnaturalización de la enzima ADN polimerasa; este problema lo resolvió Mullis en 1986, al desarrollar el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa o *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, con el cual se lograba copiar *in vitro* la secuencia de interés de forma casi ilimitada con una enzima resistente a los cambios de temperatura (Mullis, 1990).

El mayor conocimiento de las propiedades del ADN y de los cromosomas, permitieron combinar ambos métodos. En la década de 1990 se introdujo la hibridación fluorescente *in situ* o *Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)*, en la cual se hibridan pequeños fragmentos de ADN marcados con fluorocromos, los cuales se unían a los segmentos homólogos dentro de los cromosomas de una muestra en estudio. De esta forma se identificaron anomalías cromosómicas que escapaban de la resolución convencional del microscopio o permitían el análisis de cromosomas en interfase, sin el cultivo celular (Mark, 1994).

1.7 Pruebas de diagnóstico molecular

Otras técnicas que vieron la luz durante la década de los 90s, fueron el análisis de polimorfismo conformado por una cadena sencilla o *Single Strand Conformation Polymorphism –SSCP-* (Sheffield, Beck, Kwitek, Sandstrom, & Stone, 1993), con esta técnica y bajo condiciones no desnaturizantes, el ADN de hebra sencilla, adopta una conformación espacial específica a la composición de la secuencia nucleotídica que posee, configuración que se altera con el cambio de una base, lo cual es posible identificar a través de cambios en el patrón de migración electroforética en un gel de poliacrilamida (Estrada-cuzcano, 2006).

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturización o *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*, surgió en 1983 para separar fragmentos de ADN de doble hebra de igual longitud, de acuerdo a sus puntos de desnaturización, definido como el punto en que se separan las cadenas complementarias (Fischer & Lerman, 1983). Este procedimiento fue combinado con la PCR, con lo cual no fue necesaria una cantidad significativa de ADN; así se usó en el análisis de poblaciones microbianas basadas en la amplificación de fragmentos de los genes ribosomales (Muyzer, Waal, & Uitertlinden, 1993).

De forma simultánea surgieron nuevos métodos para el análisis genético: los polimorfismos de un solo nucleótido o *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*, son variantes de una sola base en la secuencia del ADN (Vargas-alarc, Tovilla-z, & Fragoso, 2013). Cuando una base se cambia por otra se pierde o se gana un sitio de clivaje para enzimas de restricción. Estos cambios permiten identificar variaciones genómicas relacionadas o no con enfermedades (David Botstein, White, Skolnick, & Davis, 1980). Además de los SNP, existen otras variantes del ADN como por ejemplo las repeticiones cortas en tándem *Short Tandem Repeats (STRs)*, *LINES* y *VNTRs* que son repeticiones de nucleótidos en tándem, los cuales se encuentran como agrupaciones o *clusters* de forma

aleatoria en el genoma (You-chun Li, Korol, Fahima, Beiles, & Nevo, 2002); la frecuencia en estas repeticiones, así como su constancia permitieron que fueran utilizados como marcadores para la identificación de regiones de interés (cartografiado genético), para la identificación de enfermedades (síndrome de X frágil y otras) y para la identificación forense (pruebas de paternidad) de una persona (Ruitberg, Reeder, & Butler, 2001); además de ello las variaciones permiten hacer un seguimiento a través de la historia, ofreciendo una visión sobre los cursos migratorios y evolutivos de una población (Calafell, Shuster, Speed, Kidd, & Kidd, 1998).

La secuenciación masiva, utiliza el principio de la secuenciación postulado por Sanger de identificar el orden en que los nucleótidos están dispuestos en la cadena de ADN; sin embargo, este método, solo se limita a un fragmento de ADN, de algunos cientos de pares de bases, lo que restringe la aplicación. Con el advenimiento de la secuenciación masiva, se puede analizar fragmentos de mayor tamaño, permitiendo secuenciar incluso genomas completos como en el caso de las bacterias.

Uno de los primeros métodos de secuenciación masiva fue la pirosecuenciación (Ronaghi, Uhlén, & Nyrén, 1998), que aprovecha avances en nanotecnología; posteriormente aparece la secuenciación de siguiente generación, la cual se realiza por ciclos repetitivos de extensión de nucleótidos, mediados por polimerasas y ciclos iterativos de ligamiento de nucleótidos, como un proceso masivo en paralelo, que genera secuencias de cientos de mega-bases a giga-bases (Voelkerding, Dames, & Durtschi, 2009).

La introducción de la secuenciación de siguiente generación, permitió un cambio en el diagnóstico de diferentes enfermedades, especialmente en oncología; Walsh y colaboradores, demostraron la aplicabilidad al usar regiones de captura para detectar mutaciones en la línea germinal en genes supresores tumorales de paciente con cáncer primario de ovario (Frese, Katus, & Meder, 2013).

1.8 Pruebas moleculares en el siglo XXI

Caracterizado por los avances tecnológicos, en el siglo XXI, los nuevos métodos de análisis molecular han proporcionado alternativas para indagar las propiedades de las células a escala genómica; métodos de alto rendimiento que incluyen estudios de asociación de genoma completo, ChIP-Seq o RNA-Seq (Hawkins, Hon, & Ren, 2012), entre otros, han proporcionado una abundancia de datos de varios niveles biológicos, con mayor predominio a nivel genómico y transcriptómico y han contribuido enormemente en la comprensión de los procesos fisiológicos celulares, así como los cambios moleculares que ocurren en las enfermedades genéticas humanas (Peterlin & Maver, 2012).

Las técnicas de secuenciación de nueva generación han disminuido considerablemente el costo de la secuenciación, pero además permiten el análisis de varios genes simultáneamente, llegando a ser una herramienta de elección para estudios genómicos. Uno de los enfoques más populares de secuenciación de nueva generación es la secuenciación del exoma, en el cual las regiones codificantes de todo el genoma son señaladas, capturadas y posteriormente secuenciadas (Samuels et al., 2014).

El exoma representa alrededor del 1.5% del genoma humano total y cuenta con aproximadamente el 85% de las mutaciones descritas en los desórdenes mendelianos (S. B. Ng et al., 2010). La aplicabilidad del exoma no es exclusiva para el estudio del genoma nuclear, este también ha sido realizado para el estudio de enfermedades mitocondriales *MitoExome* (Calvo et al., 2012).

Avances recientes en el estudio de los genomas, han permitido la investigación en las ciencias llamadas *ómicas*. La palabra *ómica* involucra el estudio del genoma o genómica, de los ARN mensajeros expresados por cada tipo de célula denominado transcriptómica, de las proteínas o proteómica, de los lípidos o lipidómica, del metabolismo y las vías metabólicas o metabolómica

(Bhati et al., 2012), de las reacciones químicas entre proteínas o reactómicas, de las modificaciones y regulaciones que recibe el ADN o epigenómica, las cuales explicarán en mayor detalle el funcionamiento de un ser vivo y el comportamiento de las enfermedades humanas. Estos estudios son realizados a través de una variedad de métodos adicionales como la espectrometría de masas en tándem, la electroforesis de proteínas, los ensayos enzimáticos, los estudios de consumo o producción de metabolitos y los ensayos funcionales.

Un ejemplo de un método de estudio en el caso de la proteómica es la espectrometría de masas en tándem, la cual permite la identificación y cuantificación de los precursores proteínicos y las proteínas y establece un perfil de expresión en cada uno de ellos (Bruce, Stone, Gulcicek, & Willimas, 2014); de esta forma se realiza un acercamiento sobre su función como componente estructural, como biomarcador o como regulador de la expresión génica (Bennike, Birkelund, Stensballe, & Andersen, 2014).

1.9 Conclusión

De esta forma se tiene un recuento de la evolución y las aplicaciones crecientes de los métodos de análisis genéticos a lo largo de la historia, desde los inicios en la Grecia antigua y las diferentes hipótesis planteadas por Hipócrates y Aristóteles, pasando por diferentes corrientes del pensamiento como la pre-formación o la selección natural, entre otras, hasta encontrar las propuestas de Mendel y Galton, cuyos paradigmas fueron las bases a partir de las cuales se construyó la genética, inicialmente como una disciplina de la biología, pero también la genética médica, aplicada al entendimiento y la solución de los problemas de salud del ser humano.

Fue necesario esperar hasta que se reconociera el ADN como la molécula responsable de portar y transmitir las características hereditarias, seguido de la identificación de la estructura del ADN, y la

identificación de las primeras enfermedades genéticas a través de alteraciones cromosómicas y moleculares, las cuales dieron prueba de enfermedades genéticas, tanto esporádicas como heredables.

El refinamiento de los métodos de diagnóstico puso en evidencia la diversidad de eventos mutacionales, con estos avances actualmente es posible el análisis simultáneo de muchos genes, incluso del exoma y también del genoma completo de un organismo en un tiempo y costo cada vez menor.

La genética médica finalmente se ha beneficiado de todos los avances de la genética humana y viene ampliando las fronteras del análisis genético, con lo cual se espera que siga expandiéndose la explosión de métodos de diagnósticos y de análisis, en todas las áreas de las ciencias ómicas. El ejercicio de la genética en el campo médico hace necesario conocer, elegir, saber usar e interpretar los resultados de los procedimientos en uso para el diagnóstico y seguimiento de las personas con patologías de índole genética; el conocimiento de los procesos implicados en cada prueba de diagnóstico o cribado, así como la precisión y limitaciones, es de suma importancia para el cuidado médico y la atención clínica, asegurando una identificación certera de la enfermedad y así procurar un adecuado tratamiento, seguimiento, asesoría y prevención.

Figura 1.1 Evolución de la genética y las pruebas genéticas a través del tiempo, S. V a.c. Hipócrates, Aristóteles, siglo XVII Jean-Baptiste Lamarck, siglo XIX Josep Adams, Mendel, Darwin, siglo XX 1900s (deVries, Correns y von Tschermak), Bateson, 1910s Garrod, Farabee, Sutton, Landsteiner, 1920s Muller, 1930s Griffith, 1950s Chase y Hershey, Franklin, Watson y Crick, 1960s Tjio y levan, Lejeune, 1970s Caspersson, enzimas de restricción (Aber, Nathans y Smith), Sanger, 1980s Mullis, FISH, 1990s análisis de polimorfismos de cadena sencilla, SNP, STR y NGS

2. PRUEBAS CITOGENETICAS

2.1. Introducción.

La citogenética es el área de la genética encargada del estudio de los cromosomas y la citogenética clínica establece la relación de estos con estados patológicos causados por anomalías en el número o la estructura de los cromosomas (Sudoyo & Hardi, 2011); la precisión en el análisis citogenético ha aumentado con la introducción de nuevos métodos de cultivo celular y por la diversificación en el procesamiento de las preparaciones cromosómicas (métodos de bandeo, FISH, etc.) (Seabright, 1971)

El cariotipo convencional en el humano tiene un nivel de resolución en promedio de 550 bandas, con el cual es posible detectar anomalías en el ADN de entre 5 – 10 Mb (megabases); mientras que el cariotipo de alta resolución involucra la sincronización de las células en profase y prometafase de la mitosis, lo que da como resultado cromosomas elongados con un mayor número de bandas, en promedio 750 bandas (Yunis J, 1976); de esta forma aumenta la capacidad de detectar anomalías como translocaciones y otros rearrreglos de menor tamaño con rangos que oscilan de 3 a 5 Mb, particularmente los de las regiones teloméricas que antes escapaban a la identificación por métodos convencionales (Kolialexi, Tsangaris, Kitsiou, Kanavakis, & Mavrou, 2005)

Dado que tanto el cariotipo convencional como el cariotipo de alta resolución presentan limitaciones para identificar deleciones, duplicaciones y otros arreglos menores a 3 Mb, fue necesario el desarrollo de otros métodos que combinan el análisis de los cromosomas junto con métodos moleculares en el ADN. Estos métodos se iniciaron con el desarrollo de la hibridación *in situ* con fluorescencia *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)* y luego con la hibridación genómica comparada *Comparative Genome Hybridization (CGH)*.

2.2 Historia de la citogenética

Varios avances permitieron la manipulación de las células hasta hacer fácilmente visibles los cromosomas. Desde las observaciones del patólogo J. Arnold, en el siglo XIX, quien realizó las primeras observaciones y los dibujos de los cromosomas humanos en células neoplásicas, seguidos por la propuesta hecha por W. Waldeyer, quien daba el nombre de cromosoma (del griego Chromo = color y soma = cuerpo), a estas estructuras luego de poder teñirlas (Riegel, 2014).

Otros avances permitieron la manipulación *in vitro* de las células; en 1930 ya se usaba colchicina en citogenética de plantas (Riegel, 2014) y esta fue adicionada a los cultivos celulares humanos para detener la migración de los cromosomas hacia los polos en la metafase. El tratamiento de las células cultivadas con una solución hipotónica, permitió extender y fijar los cromosomas fuera de la célula sobre una lámina porta objeto para el análisis microscópico (Speicher, 2010).

En 1955 H. Eagle introdujo también un medio de cultivo específico (Eagle, 1955), con lo que se obtuvo en el laboratorio el crecimiento controlado *in vitro* de las células humanas y P. Nowell en 1960 mostró el efecto de la fitohemaglutinina como estimulante del crecimiento celular de los linfocitos sanguíneos (Nowell, 1960)

Las células somáticas humanas normales cuentan con 46 cromosomas, distribuidos en 22 pares de autosomas y 1 par de cromosomas sexuales, que son XX para las mujeres y XY para los hombres (Tjio, 1978).

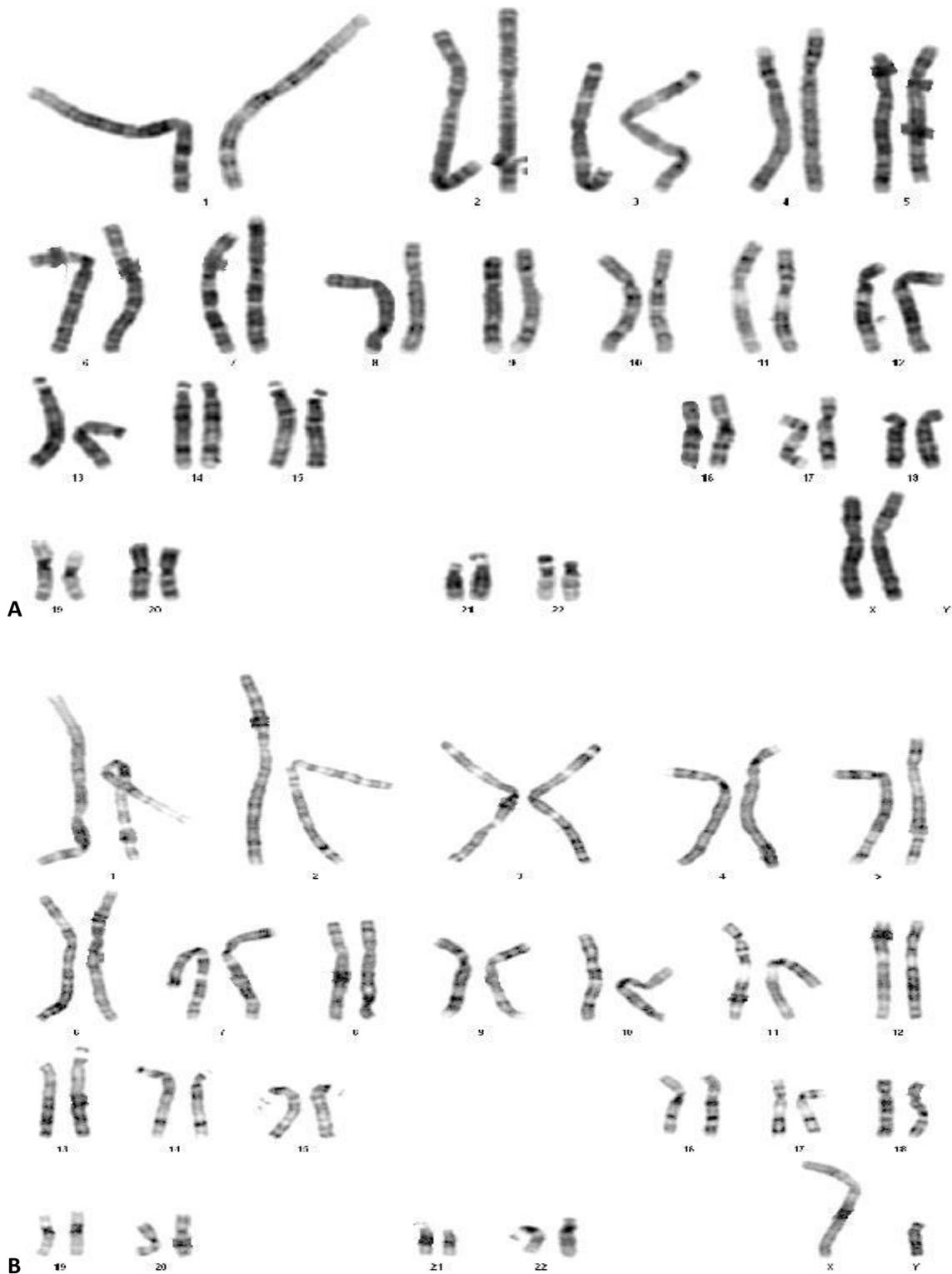
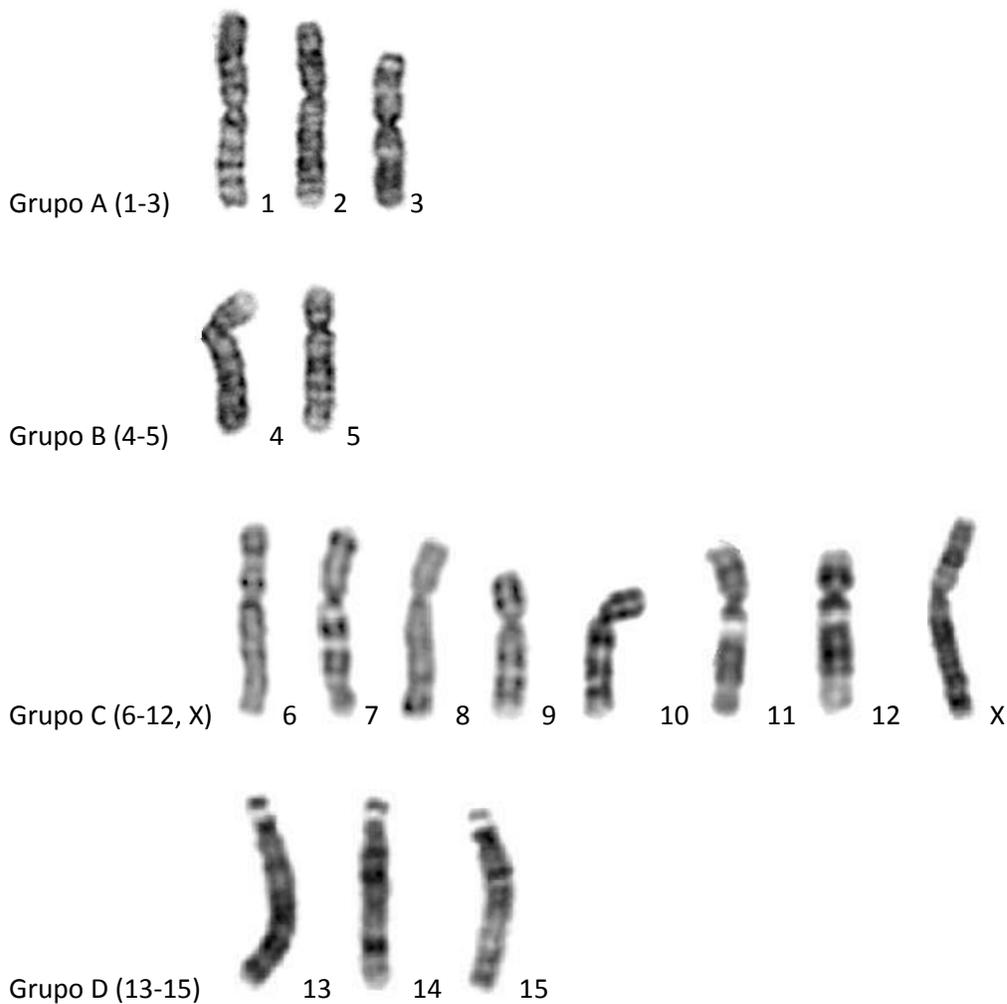


Imagen 2.1. Cariotipo bandeado G. **A.** cariotipo de XX femenino. **B.** cariotipo XY hombre. Imágenes cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá, Colombia.

Luego de precisar el número correcto de cromosomas, fue necesario unificar el sistema de nomenclatura citogenética, este proceso se inició en la conferencia de citogenética de Denver en 1960 y que ha recibido posteriormente varias modificaciones, siendo la última realizada en 2016 (A.R. Brothman, Person, & Shaffer, 2010).

Los cromosomas se clasifican en 7 grupos, de acuerdo con el tamaño y la posición del centrómero, cada grupo se identifica con las letras desde la A hasta la G (Hamerton, Jacobs, & Klinger, 1972). Esta forma de clasificación permitió relacionar las alteraciones inicialmente en el número y luego en la estructura de los cromosomas con algunas enfermedades congénitas.



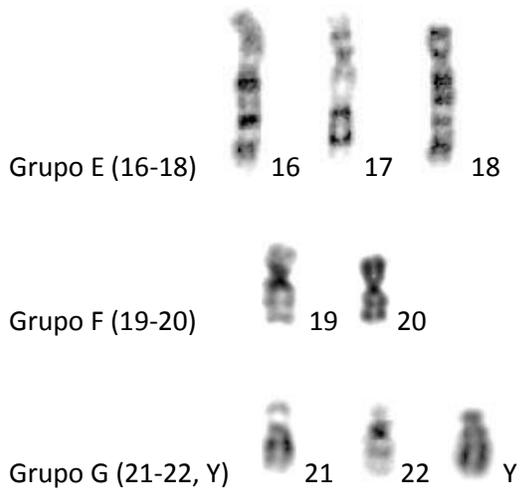


Imagen 2.2. Clasificación cromosómica por grupos, adaptada a partir de las imágenes proporcionadas por los doctores Serrano, López y Estrada.

La primera evidencia de una alteración numérica proviene del trabajo de J. Lejeune, quien identificó la trisomía 21 como la etiología del síndrome Down en 1959 (Megarbane et al., 2009) y la delección del brazo corto del cromosoma 5 (del5p) en el síndrome Cri du Chat en el año 1961 (Lejeune et al., 1963): De la misma manera, K. Patau identificó la trisomía del cromosoma 13 (Patau, Smith, Therman, Inhorn, & Wagner, 1960) y J. Edwards a la trisomía 18 (J. H. Edwards, Harnden, Cameron, Crosse, & Wolff, 1960).



Imagen 2.3. Alteraciones numéricas **A.** trisomía 21 síndrome Down, **B.** trisomía 18 síndrome Edwards, **C.** trisomía 13 síndrome Patau, imágenes cortesía de los doctores López, Estrada; imagen C, cedida cortésmente por la doctora Nara García Quintero, Hospital General de México, Ciudad de México, México, (García Quintero, Chavez Guerrero, & Miranda del Olmo, 2003) .

Seguidamente se evidenciaron alteraciones numéricas en los cromosomas del sexo, como es el caso del síndrome Klinefelter descrito inicialmente en 1942 como un cuadro de infertilidad, azoospermia y aumento de las gonadotropinas urinarias, este fenotipo fue luego relacionado en 1959 con la presencia de un cromosoma X adicional en el cariotipo de un hombre (Klinefelter, 1986) y luego, el fenómeno contrario, la ausencia de un cromosoma X en el síndrome Turner, descrito clínicamente en 1938, pero confirmado a través de la citogenética hasta la década de 1960 por Ford y colaboradores (Zinn, Page, & Fisher, 1993). Siendo estas dos alteraciones las de mayor frecuencia, sin embargo es posible encontrar otras variantes en el número de cromosomas sexuales como por ejemplo el síndrome triple X o la pentasomía del cromosoma X, entre otros.

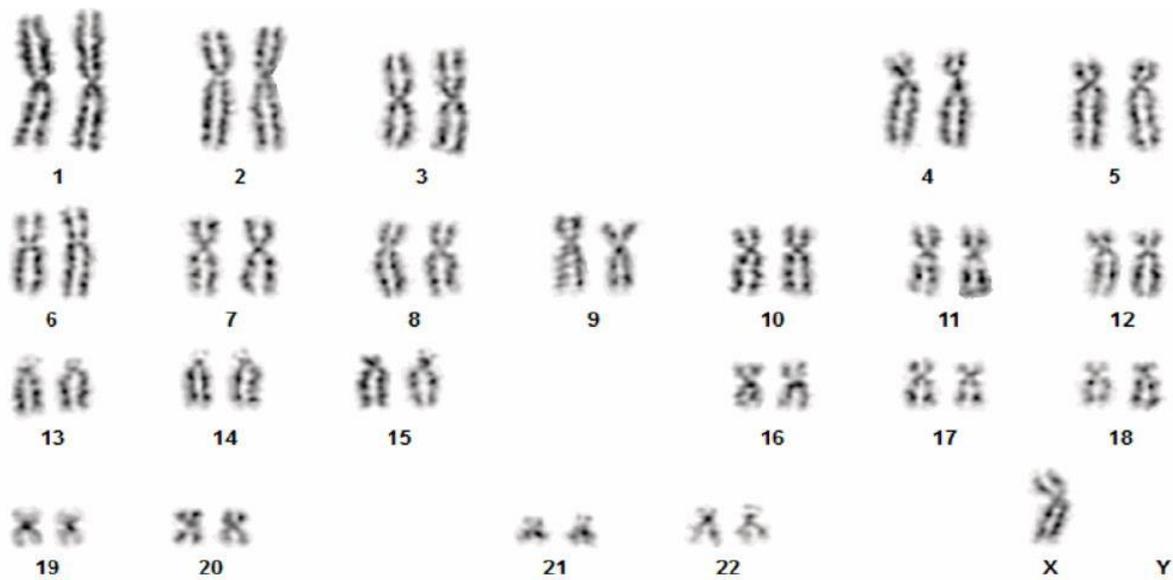


Imagen 2.4. Cariotipo femenino 45,X síndrome Turner, cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

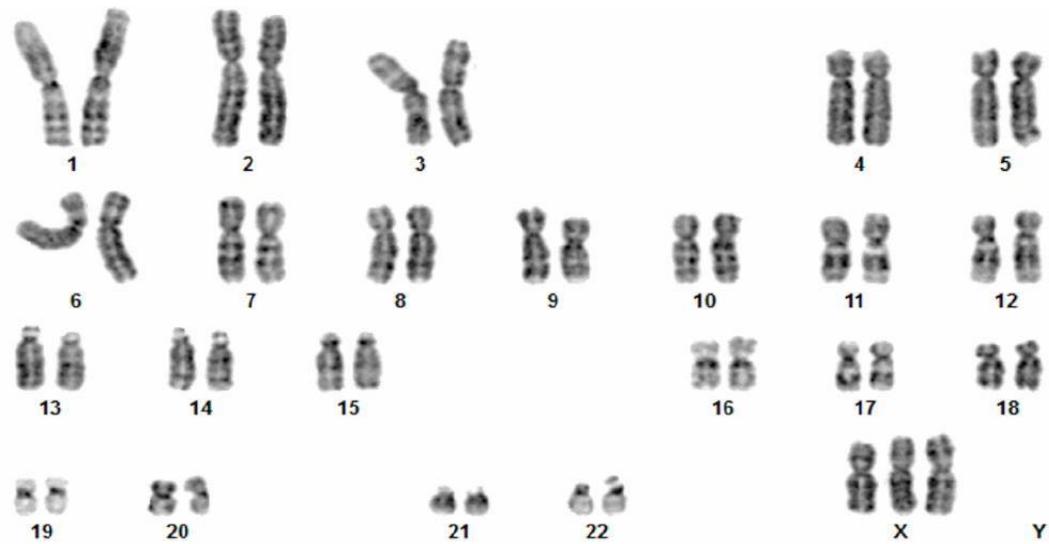


Imagen 2.5. Cariotipo femenino 47,XXX síndrome triple X, cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

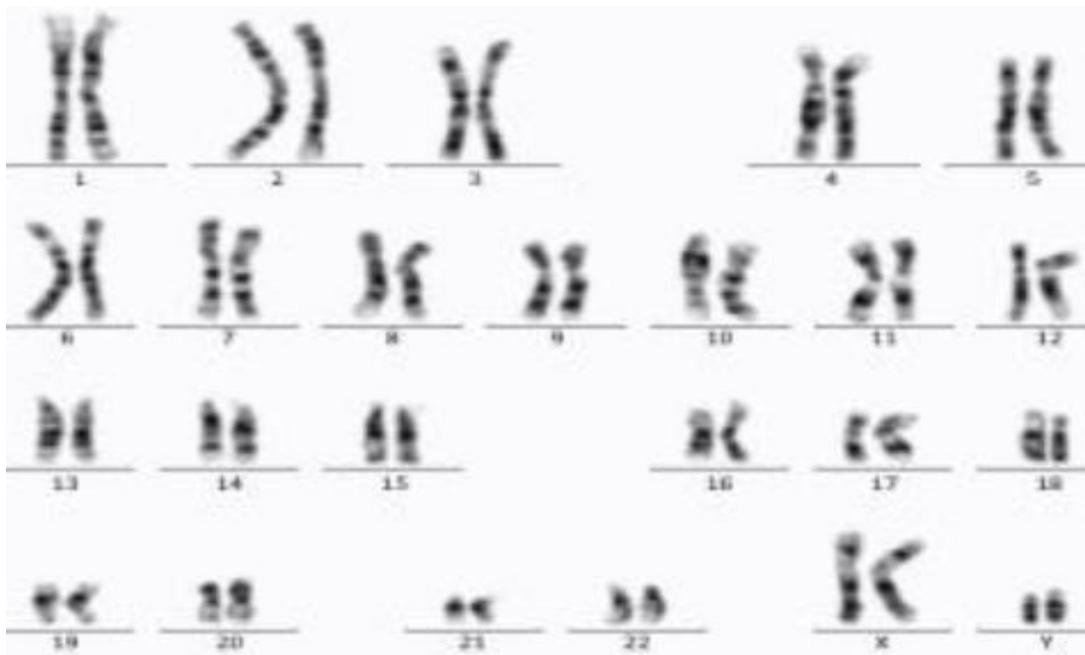


Imagen 2.6. Cariotipo masculino con complemento cromosómico anormal 48,XXYY, correspondiente a una variante del síndrome Klinefelter. Cortesía del biólogo Esteban Medina, genética molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

El estudio de los cromosomas se refinó más adelante con la introducción de diversos métodos de tinción que facilitaron no solo el conteo básico del número de cromosomas, sino también el análisis detallado de la estructura de los mismos, permitiendo la identificación de cambios en la forma, en el tamaño, en la localización de los brazos y en la posición del centrómero.

Los métodos de tinción para obtener bandas sobre los cromosomas partieron del uso de un colorante fluorescente llamado quinacrina, seguido de la observación de los cromosomas bajo un microscopio de fluorescencia (Caspersson et al., 1970), esto permitió observar un patrón de segmentos fluorescentes brillantes que correspondían a regiones cromosómicas ricas en AT (adenina-timina) y los segmentos opacos correspondían a regiones ricas en GC (guanina-citosina), a este método se le denominó bandeo Q (quinacrina).

No obstante, el patrón de bandeamiento Q de los cromosomas era efímero debido a que la fluorescencia desaparecía en un corto tiempo (alrededor de 30 minutos) y la necesidad de un microscopio de fluorescencia, impulsaron la introducción de otros métodos de bandeamiento que utilizaban la digestión de las proteínas asociadas a los cromosomas en el ADN, por medio de enzimas proteolíticas como la tripsina, seguidos de la tinción con un colorante llamado Giemsa, para luego ser llevado a microscopia de luz convencional. Esta técnica lograba una coloración de la preparación casi permanente (M. E. Drets & Shaw, 1971) y los cariotipos realizados por este método se denominaron entonces cariotipo con bandas G (Giemsa).

La variación en los métodos de bandeamiento produjo las bandas C (centrómero), usando el colorante Giemsa, que permiten la observación más adecuada de las regiones centroméricas de los cromosomas por la presencia allí de trectos de ADN repetitivo (Pardue & Gall, 1970).

Luego se presentó el bandeamiento R (reverso), que muestra un patrón de bandas invertido al que observa en el bandeo G, es decir que las bandas que son observadas como oscuras en el bandeo G,

en el bandeamiento R son observadas claras y viceversa (Dutrillaux & Lejeune, 1975); luego de la realización de las bandas R, Dutrillaux y Lejeune notaron la presencia de un mayor nivel de tinción en las regiones terminales de los cromosomas que luego, tras modificar el proceso de tinción para las bandas R, se obtuvo una tinción fuerte de los extremos de los cromosomas, que contrasta con la tinción tenue en el resto de ellos y a estas bandas se les denominó bandas T (telómeros) (E. Drets, 2002).

Después surgió un método para la tinción de las regiones de organización nucleolar, llamado bandeamiento NOR (MATSUI & SASAKI, 1973) y, finalmente, se desarrolló el cariotipo con bandeamiento de alta resolución, con el que se alcanza un mayor número de bandas y mayor longitud del cromosoma, usualmente realizado con bandas R y que permite un mejor nivel de análisis comparado con los métodos clásicos de bandeamiento (Moore & Best, 2001).

No obstante los avances que permitieron un análisis más detallado de los cromosomas en lo relativo a los defectos estructurales, las limitaciones de la citogenética convencional y de alta resolución obligaron al desarrollo de métodos capaces de identificar alteraciones cromosómicas que se escapan a la resolución del microscopio de luz, regularmente 1000X (aumentos). Estos métodos identifica microdeleciones, microduplicaciones (entendiendo por microdelección o microduplicación a los defectos estructurales que escapan o son dudosos a la resolución de 1000X) o arreglos de menor tamaño, usando una combinación entre métodos moleculares y métodos citogenéticos.

El primer acercamiento entre la citogenética y la biología molecular ocurrió en 1969 por J. Gall y M. Pardue, quienes describieron un método de hibridación del ARN marcado radioactivamente con el ADN nuclear, sobre laminas portaobjetos, para delimitar e identificar regiones específicas dentro del cromosoma (Pardue & Gall, 1969); posteriormente T. Caspersson reemplazó el marcaje radioactivo, por uno basado en fluorescencia, con lo que se redujeron los riesgos de exposición a

radiaciones ionizantes y las dificultades técnicas derivadas del uso de radioactividad y la autoradiografía (Caspersson, Zech, & Johansson, 1999).

Así, el primer método de citogenética molecular conocido fue la hibridación en situ fluorescente (FISH), que se introdujo en la década de 1980; modificaciones posteriores de este método, dieron origen a variantes del cariotipo, como el cariotipo multicolor o *Spectral Karyotyping (SKY)* y el FISH multicolor (M-FISH), seguido de la hibridación genómica comparada o *Comparative Genomic Hybridization (CGH)* en 1992, y una variante posterior, el array-CGH en 1997 (Andrieux & Sheth, 2009),

2.3. El cariotipo

2.3.1. Cariotipo Convencional

El cariotipo es la organización del complemento cromosómico de una especie de acuerdo con el tamaño y la posición del centrómero; el cariotipo tiene por objetivo observar anomalías en el número o en la estructura de los cromosomas (Bickmore, Human, & Unit, 2001)

Para lograr esto, se debe seguir un proceso a partir de muestras biológicas como sangre, células descamadas de la mucosa oral, fibroblastos obtenidos de la piel, células de biopsias de tejidos y líquido amniótico, entre otros (Rondon & Rangel, 2012).

Es importante aclarar que cuando se parte de una muestra de sangre, ésta es tomada en un tubo con el anticoagulante heparina. Luego de obtener la muestra, se procede a realizar un cultivo celular en medios específicos que contienen una mezcla de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, bicarbonato de sodio y suero fetal bovino (SFB), los cuales proveen nutrientes y factores de crecimiento a las células en crecimiento; se adiciona al cultivo celular el agente mitogénico

fitohemaglutinina, que induce la división células de los linfocitos, adicionalmente se agregan antibióticos que evitan la proliferación bacteriana durante el proceso de incubación, que se extiende usualmente por 72 horas a una temperatura de 37°C (Chou & Yang, 2014)

Una vez ha transcurrido el tiempo de incubación, se adiciona al cultivo celular una solución a base de colchicina que frena la migración de los cromosomas hacia los polos de la célula. Esta sustancia actúa solo en aquellas células que se encuentran en metafase de la mitosis durante el ciclo celular. Seguidamente se agrega una solución hipotónica, basada en cloruro de potasio generalmente (B. L. Ng & Carter, 2006), que permite la lisis de las membranas de las células y la exposición de los cromosomas por fuera del núcleo, los cuales se fijan a una lámina portaobjetos (Therman & Susman, 1994).

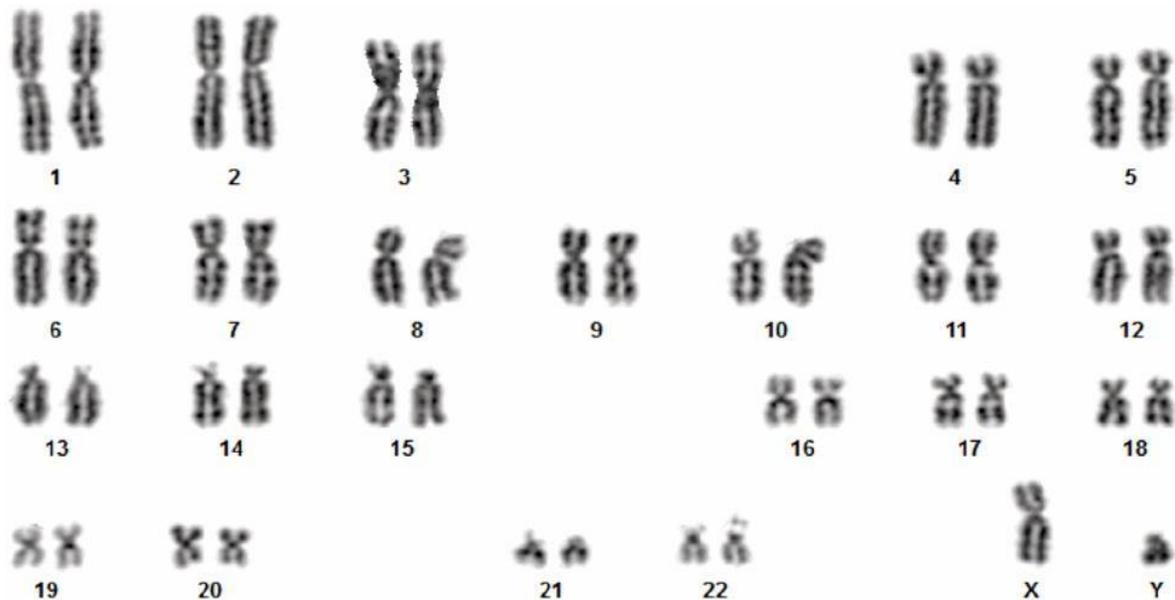


Imagen 2.7. Cariotipo convencional 550 bandas. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsánitas, Bogotá, Colombia.

2.3.2 Cariotipo de Alta Resolución

El cariotipo de alta resolución es una variante del cariotipo convencional consistente en obtener cromosomas elongados con un menor estado de empaquetamiento o condensación; esto se logra mediante la sincronización del cultivo celular adicionando metrotexate (ametopterina: un medicamento anticanceroso que inhibe el ácido fólico), el cual bloquea la mitosis de todas las células menos de aquellas que superaron la fase S del ciclo celular. A diferencia del cultivo celular clásico para obtener cromosomas, las células del cariotipo de alta resolución se detienen en la profase tardía o en la pro-metáfase o en la metafase temprana (Moore & Best, 2001). Los cromosomas elongados permiten la observación de un número mayor de bandas, desde 600 hasta 1.400 y pueden evidenciar alteraciones de menor tamaño, entre las 3–5 Mb, con lo cual se duplica la resolución que se logra en un cariotipo convencional (Andrieux & Sheth, 2009).

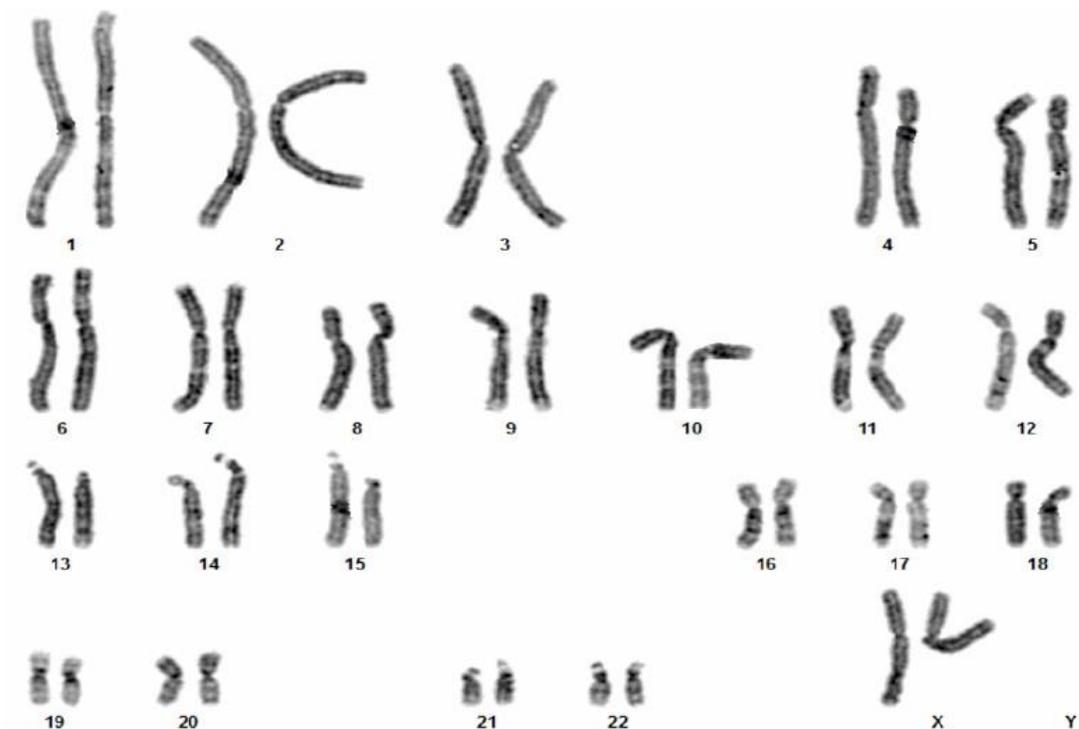


Imagen 2.8. Cariotipo de alta resolución 750 bandas. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

Finalmente se procede a realizar el método de tinción, sea homogénea o por bandeamiento, de acuerdo a las necesidades de estudio.

2.4 Métodos de tinción para bandeamiento

2.4.1. Bandas Q

Este es considerado como el primer método de bandeamiento en cromosomas humanos, consiste en agregar al extendido de los cromosomas sobre la lámina portaobjetos una solución fluorescente como quinacrina (atebrina: un derivado sintético de la naranja de acridina y similar al antimalárico primaquina), la cual se intercala en las regiones ricas en uniones A=T principalmente de la heterocromatina, generando fluorescencia con un patrón de bandas brillantes y similares a las bandas G, con lo cual se identifica cada cromosoma (Gersen & Keagle, 2005).

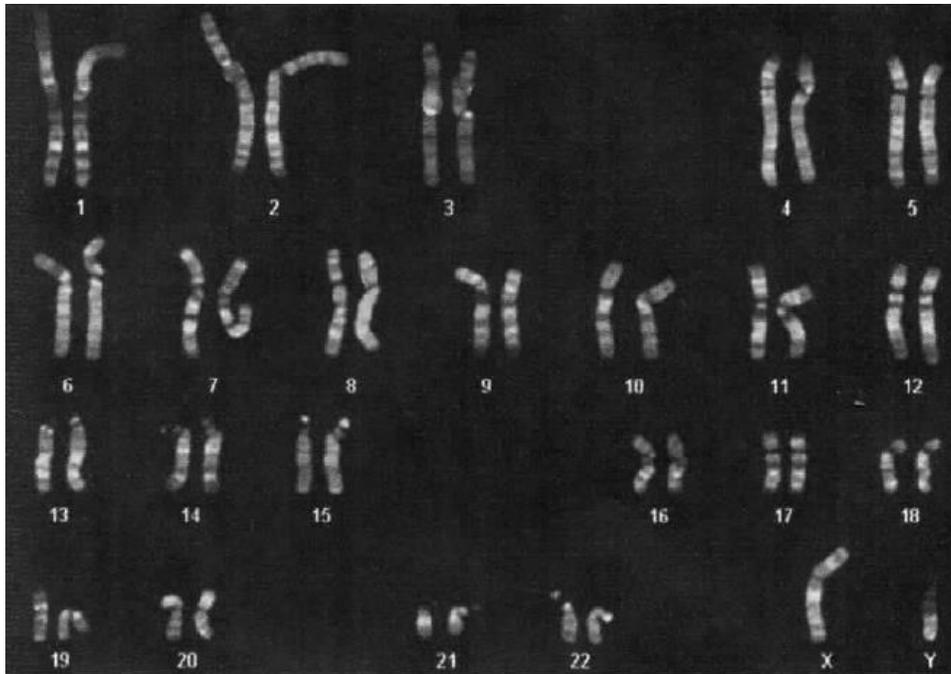


Imagen 2.9. Cariotipo bandeamiento Q. Cortesía de la doctora Clemencia Sabogal. Fundación Gillow, Bogotá, Colombia

2.4.2 Bandas G

Es un método de bandeamiento en el cual los cromosomas son sometidos a desnaturalización de las proteínas mediante la enzima tripsina, seguida de la tinción con el colorante Giemsa (Moore & Best, 2001). Se obtiene un patrón de bandas claras que corresponden a las regiones de replicación reciente del ADN (más ricas en genes o eucromáticas) y bandas oscuras (pobres en genes o heterocromáticas), que son de replicación tardía.

De acuerdo con el nivel de bandeo alcanzado en el cariotipo (número de bandas visibles en los cromosomas), el bandeamiento G permite identificar anomalías numéricas y estructurales con una resolución máxima de 10 MB en un cariotipo de hasta 550 bandas. Este nivel de bandeo se define contando de manera estándar el cromosoma 1 (región p31-p32), el cromosoma 10, el brazo corto del cromosoma 11, el brazo largo del cromosoma 12 y el cromosoma X (Welborn & Welborn, 1993).

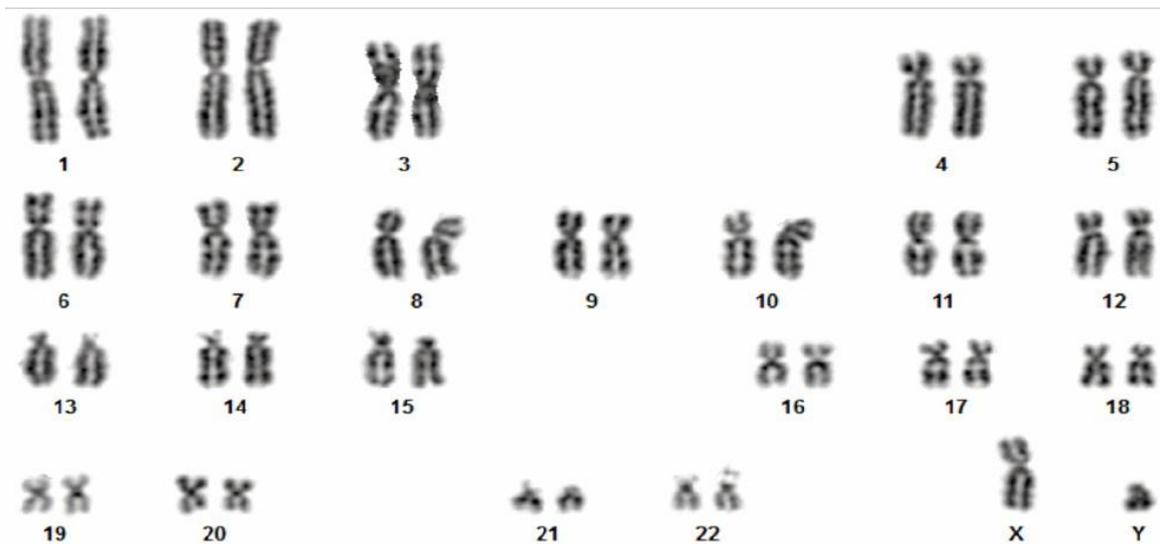


Imagen 2.10. Cariotipo bandeamiento G. Nótese alargamiento del tallo en el brazo corto del cromosoma 22 (22pstk+), el cual se considera heteromorfismo normal. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

2.4.3 Bandas R

Las bandas R logran un patrón de bandas reverso al observado en el bandeamiento G. Este se logra sometiendo las láminas portaobjetos con el extendido de cromosomas al calor (80-90°C), para luego ser teñidos con Giemsa. La tinción permite hacer un contraste con respecto a las bandas G clásicas, donde las regiones oscuras observadas del bandeo G se aprecian claras en el bandeamiento R (Sperber & Sperber, 2008) y lo contrario para las bandas claras G que son oscuras en las R.

2.4.4 Bandas C

Como se mencionó con anterioridad, el bandeamiento C permite la visualización de las regiones centroméricas y peri-centroméricas ricas en heterocromatina (Arrighi & Hsu, 1971). Para obtener las bandas C se utiliza la técnica básica de coloración con Giemsa; sin embargo, antes de la tinción, los cromosomas son tratados con álcalis como hidróxido de sodio o de bario, procedimiento que realza las regiones heterocromáticas del cromosoma, particularmente las que se hallan alrededor del centrómero y lográndose la identificación de los polimorfismos presentes en estas regiones (Eiberg, 1973).



Imagen 2.11 Cromosomas con bandeamiento C (Contreras, Silva, & Mateus, 2009). Cortesía de la bióloga Nora Contreras, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

2.4.5. Bandas NOR

En el bandeamiento NOR (*Nucleolar Organizer Region*) los cromosomas fijados en la lámina portaobjetos se ponen en contacto con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) durante 48 horas; posteriormente se realiza una tinción con el colorante Giemsa (Ponnuraj, 2011); con este método es posible identificar la presencia normalidad o anormalidad en las regiones de ADN satélite localizadas en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) (Martínez-Expósito, Méndez, & Pasantes, 1997).

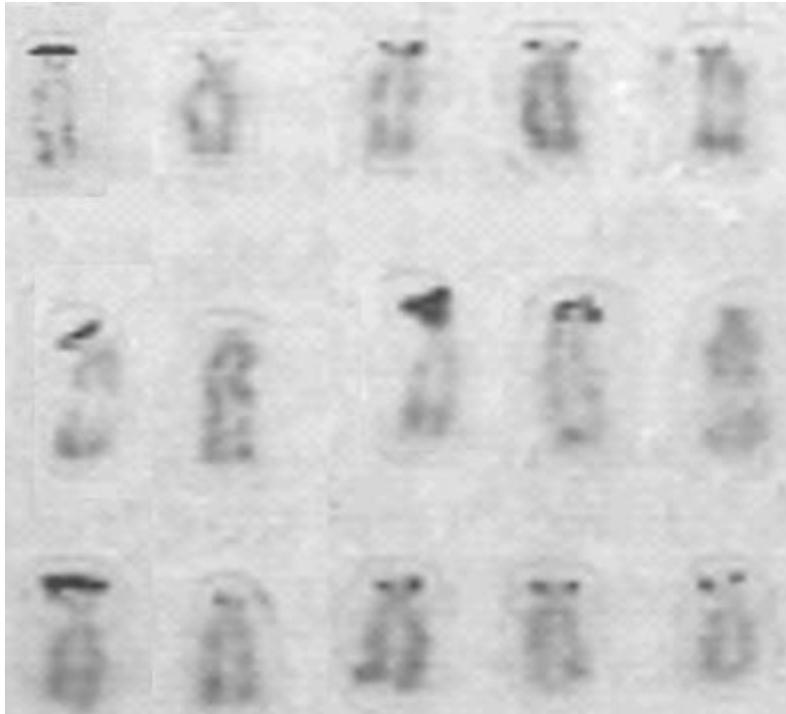


Imagen 2.12 Cromosomas con bandeamiento NOR (Contreras et al., 2009). Cortesía de la bióloga Nora Contreras, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

2.5 Características de los cromosomas

El cromosoma representa el máximo estado de condensación del ADN y está conformado por dos cromátides hermanas, las cuales se encuentran unidas por una región denominada centrómero que sirve como punto de referencia para la clasificación de los mismos y determina la presencia de un brazo corto (p) y un brazo largo (q), de acuerdo con su ubicación respecto a los extremos del cromosoma.

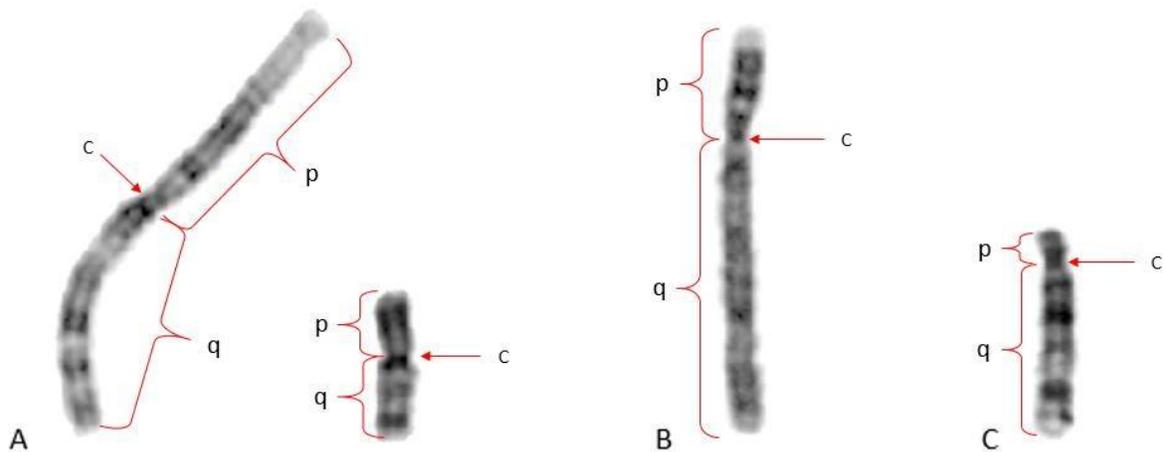


Imagen 2.13. Los tres tipos de cromosomas presentes en el humano. Se identifican el brazo corto (p), el brazo largo (q) y el centrómero (c)

A: Se observa un cromosoma metacéntrico (cromosomas 1, 3, 16, 19 y 20), donde los brazos cortos y largos mantienen una longitud similar. B: Se observa un cromosoma sub-metacéntrico (cromosomas 2, 4, 5, 6 – 12, 17, 18 y X), con una mayor longitud del brazo largo, respecto al brazo corto. C: Se observa un cromosoma acrocéntrico (cromosomas 13, 14, 15, 21, 22 y Y), con los brazos cortos sensiblemente pequeños comparados a los brazos largos. Imágenes cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá, Colombia.

Además de los cromosomas metacéntricos, sub-metacéntricos y acrocéntricos, existe un grupo de cromosomas identificados como telocéntricos, quienes tienen el centrómero en uno de sus extremos y no cuentan con brazos cortos. Este tipo de cromosomas no se encuentra en el humano normal, pero es normal en otros organismos.

2.6. Análisis de los cromosomas

Una vez se ha realizado cualquiera de los métodos de bandeamiento se procede al análisis de las muestras para tratar de identificar anomalías numéricas y estructurales, lo cual se realiza bajo el microscopio. Con un aumento de 100X se localizan las metafases a lo largo de la lámina portaobjetos, anotándose las coordenadas del hallazgo; y el conteo de los cromosomas se realiza normalmente con un aumento 1000X. Se ha establecido que el número de metafases a ser contadas de manera rutinaria en todos los casos debe ser mayor a 17 y se deben analizar en detalle entre 5 a 10 células; de estas, usualmente se fotografían 2 para ser presentadas en el reporte por el laboratorio (Gersen & Keagle, 2005).

Una vez se ha realizado el análisis a través del microscopio de luz, se procede a realizar el respectivo reporte de los hallazgos, estos se hacen por medio de un sistema codificado el cual es estandarizado por el Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) ISCN por sus siglas en inglés (Simons, Shaffer, & Hastings, 2013), cuya última edición es de 2016.

2.7. ANALISIS DE NUMÉRO Y ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS

El hallazgo repetido de un número cromosómico distinto a 46, con un cromosoma adicional (47), configura el diagnóstico de trisomía (tres cromosomas presentes para un determinado par cromosómico, siendo la más común la trisomía para el cromosoma 21 o Síndrome Down). Cuando el hallazgo muestra 45 cromosomas se habla de Monosomía (ausencia de un miembro de un par cromosómico determinado), teniendo como ejemplo común en humanos la Monosomía X (Síndrome Turner). Otras trisomías viables son el Síndrome Edwards (Trisomía 18) y el Síndrome Patau (Trisomía 13) y con frecuencia se observa también el Síndrome Klinefelter, donde se tiene la

presencia de, al menos, dos cromosomas X junto con un cromosoma Y. Los síndromes triple X (47,XXX) y de dos cromosomas Y (47,XYY), llamados respectivamente súper-hembra y súper-macho se observan ocasionalmente. Las demás trisomías y monosomías se consideran no viables y muchas de ellas se observan en estudios cromosómicos en material de aborto humano (Taucher et al., 2014).

Cuando el número de cromosomas no presenta alteración, se debe evaluar las características estructurales de estos, debido a que pueden presentar anomalías que alteran su arquitectura, estas anomalías incluyen adiciones o pérdidas de segmentos cromosómicos, así como cambios en la forma de los cromosomas; de igual manera se debe evaluar la presencia de hendiduras o *gaps*, los cuales pueden ser indicadores de posibles sitios de ruptura, que ocasionen la inestabilidad del cromosoma (Ma et al., 2012).

En los casos que, bajo el análisis y conteo de 17 metafases se halle una metafase hipodiploide o hiperdiploide, se debe ampliar el conteo a más de 30 metafases con el objeto de identificar si el fenómeno se repite y se trata de un mosaicismo cromosómico (Hastings, Howell, Bricarelli, Kristoffersson, & Cavani, 2012b), que es definido como la presencia en un mismo individuo de 2 o más líneas celulares cada una de ellas con un cariotipo diferente, estas líneas celulares con cariotipos diferentes pueden resultar de una no disyunción post cigótica, una anafase retrasada, o un re-arreglo estructural (Maciel-guerra et al., 2012).

2.8. Cariotipo normal

Si en todas las células se observa un número diploide de 46 cromosomas y en ninguna de las metafases se observan alteraciones estructurales, éste será informado como normal, sea 46,XX para la mujer o 46,XY para el hombre.

El informe final de un cariotipo debe seguir el siguiente orden, lo primero que se debe leer es el número total de cromosomas hallados en el extendido que incluye los cromosomas sexuales, el cual debe ser 46 en un cariotipo normal; seguido de ello debe encontrarse una coma (,) e inmediatamente después de ella y sin espacio se encuentran registrados los cromosomas del sexo y en algunos reportes se puede encontrar registrado entre corchetes [], el número de metafases analizadas.

46= número total de cromosomas que resulta de la suma de autosomas y cromosomas sexuales

XX= constitución de cromosomas sexuales en un individuo femenino

XY= constitución de cromosomas sexuales en un individuo masculino

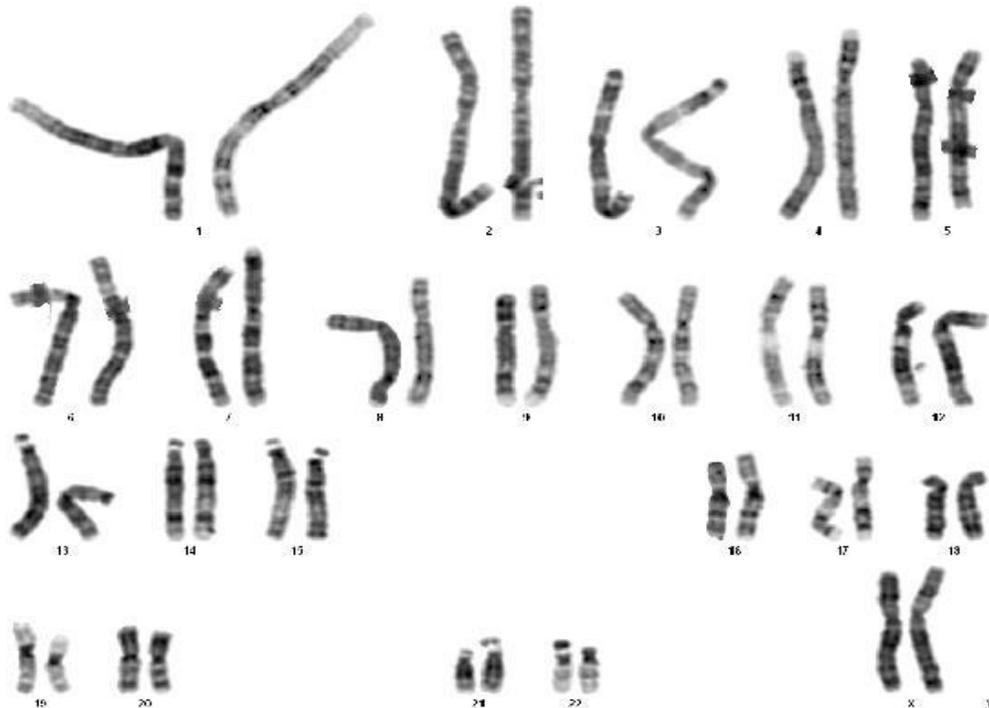


Imagen 2.14. Cariotipo 46,XX: cariotipo con un número normal de cromosomas que corresponde a una mujer. Cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá, Colombia

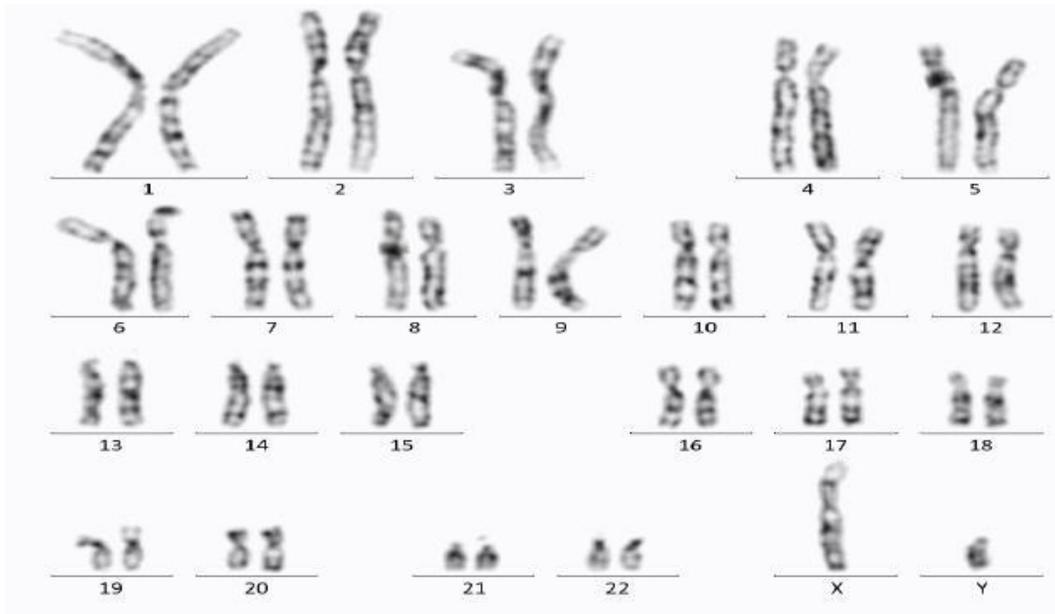


Imagen 2.15. Cariotipo 46,XY: cariotipo con un número normal de cromosomas que corresponde a un hombre. Cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá, Colombia

2.9. Características cromosómicas variables normales

Se debe tener en cuenta que en algunas situaciones se presentan cariotipos con características que aunque no son constantes de forma general, puede estar dentro de la normalidad de estos, como es el caso de diferencias en el tamaño, la intensidad de coloración o la presencia de sitios de fragilidad en los cromosomas (Arthur R Brothman et al., 2006).

La variación en la longitud de los cromosomas puede estar dada por el aumento o disminución en la longitud de los segmentos heterocromáticos (h), también puede encontrarse un aumento en el tamaño de los tallos o *stalk* (*stk*), que son los segmentos ubicados entre el satélite y el centrómero en los cromosomas acrocéntricos, o por aumento en el tamaño de los satélites (s); así mismo se debe tener en cuenta que el aumento en la longitud es representado por el signo (+) más y una disminución de la misma se representa por el signo (-) menos (Simons et al., 2013).

Cuando se presenta cualquiera de estos cambios, van a ser reportados en el cariotipo junto al número del cromosoma correspondiente, por ejemplo un aumento en la longitud del brazo largo del cromosoma 18 es reportado de la siguiente forma 18qh+, de igual manera sucede con un aumento en la longitud de los tallos que sería reportado así 22pstk y su interpretación es un aumento en la longitud del tallo del cromosoma 22 y finalmente una variación en el tamaño de los satélite se reporta en el cariotipo de esta manera 15ps+, y se interpreta como un aumento en el tamaño del satélite en el cromosoma 15.

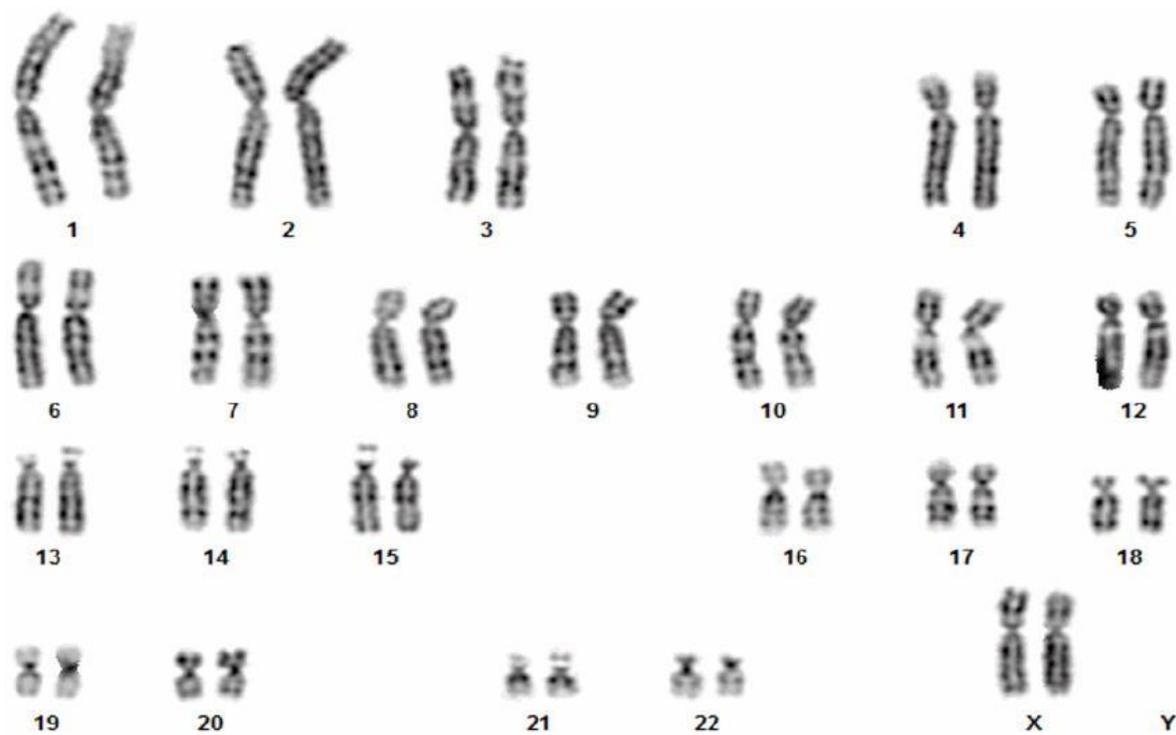


Imagen 2.16. Cariotipo con heteromorfismos, bandeado G 550 bandas, femenino normal, se evidencia aumento en la longitud de la heterocromatina en el brazo largo de los cromosomas 1 (1qh+) y 16 (16qh+); se observa un incremento en la longitud del tallo sobre el brazo corto del cromosoma 15 (15pstk+). Estos hallazgos son considerados heteromorfismos normales. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

2.10. Cariotipo anormal

En las situaciones particulares en las cuales se halle una anomalía en el número o la estructura de los cromosomas, estas deben ser reportadas en el cariotipo siguiendo los parámetros establecidos por ISNC, en ellos se indican que luego de reportar el número de cromosomas encontrados se debe reportar en primera instancia las anomalías en los cromosomas sexuales, comenzando con el cromosoma X, luego las encontradas en el cromosoma Y; posteriormente se registrarán las anomalías de los autosomas siguiendo el orden de numeración, seguido del registro primero las alteraciones numéricas y luego las alteraciones estructurales (Simons et al., 2013).

2.10.1. Anomalías numéricas

El set cromosómico humano es diploide; en los casos que se presente un número de cromosomas diferente al normal, se denomina heteroploide; cuando este número es múltiplo del número haploide se denomina euploidia, pero cuando no lo es, se denomina aneuploidía cuando solo se ven afectados algunos pares de cromosomas por ejemplo monosomías, trisomías, o tetrasomías, pero cuando es el set completo de cromosomas el que se ve afectado, se denomina poliploidías, en ellas el número completo de cromosomas está duplicado, triplicado, etc., (M. M. García, Martínez, & Barreiro, 2016).

En el caso de las aneuploidías, cuando son reportadas en el cariotipo, estas van indicadas por el signo más (+) cuando hay ganancia de un cromosoma o el signo menos (-) cuando hay pérdida de uno de ellos, seguidos por el número del cromosoma que está afectado, por ejemplo un cromosoma 21 extra es reportado 47,XY,+21; o la pérdida del cromosoma X es reportado 45,X,-X (Simons et al., 2013).

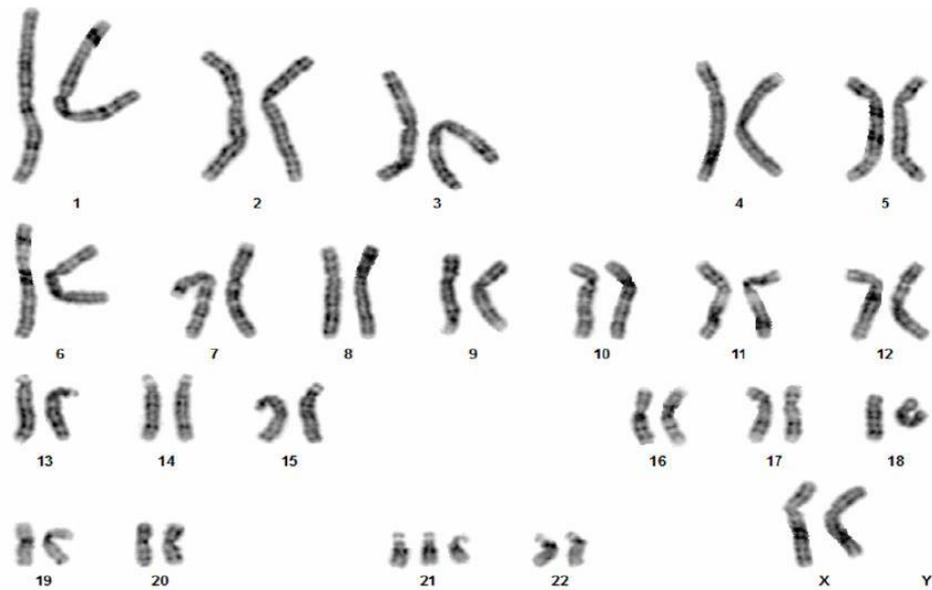


Imagen 2.17. Anormalidad numérica trisomía 21: Cariotipo femenino que muestra una trisomía 21 libre (síndrome Down). Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

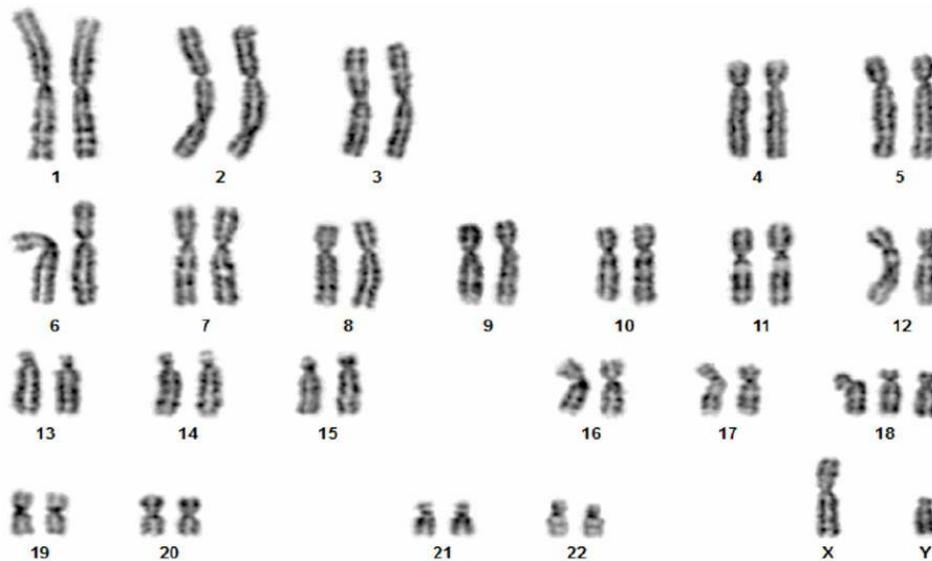


Imagen 2.18. Anormalidad numérica trisomía 18: Cariotipo masculino con trisomía 18 (síndrome Edwards). Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

2.10.2 Anormalidades estructurales

Las anomalías estructurales hacen referencia a las modificaciones en la forma de los cromosomas, para ser descrito, se reporta primero la alteración con su abreviatura correspondiente, seguido del número del cromosoma afectado (Tharapel, 1999). A continuación se hará la descripción de las diferentes anomalías estructurales de acuerdo a lo consignado en el ISCN (Simons et al., 2013).

- Deleción (*del*): indica la pérdida de un segmento del cromosoma, puede ser de localización intersticial o terminal. Para su codificación en el cariotipo, se debe colocar primero la abreviatura seguido del número del cromosoma afectado, a continuación se describe el brazo y la región afectada.



Imagen 2.19. Cariotipo 46,XX,del(18)(q21.3), describe un cariotipo femenino que presenta la deleción de un fragmento del brazo largo del cromosoma 18. Cortesía del doctor Carlos Estrada, COLCAN, Bogotá, Colombia.

- Cromosoma derivado (*der*): se refiere al re arreglo que se involucra dos cromosomas, el termino se aplica al cromosoma que permanece con el centrómero intacto, su registro se realiza colocando primero la abreviatura, seguido por el número del cromosoma.



Imagen 2.20. Cariotipo 44,X,der(13:14)(q10;q10), se describe como un cariotipo femenino que muestra un solo cromosoma X (síndrome Turner), y la presencia de un cromosoma derivado por la translocación entre el brazo largo de un cromosoma 13 y el brazo largo de un cromosoma 14. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsánitas, Bogotá, Colombia.

- Cromosoma dicentrico (*dic*): cromosoma que presenta dos centrómeros, su origen se debe a la unión de dos segmentos de cromosomas, homólogos o no, donde cada uno contiene su centrómero, para su registro se siguen las mismas especificaciones previstas para la deleción.

- Duplicaciones (*dup*): hace referencia a la repetición de un segmento del cromosoma, en este caso, el registro se realiza colocando la abreviatura luego de los cromosomas sexuales, seguido, se coloca el número del cromosoma comprometido y finalmente se coloca el brazo y la región que se encuentra duplicada.



Imagen 2.21. Duplicación del segmento identificado con el número 5 en un cromosoma submetacéntrico (Contreras et al., 2009). Cortesía de la bióloga Nohora Contreras, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

- Inserciones (*ins*): la inserción se caracteriza por la presencia de un fragmento de un cromosoma denominado donante dentro de otro cromosoma que se denomina receptor, las inserciones pueden ser directas, si la orientación de las bandas es igual a la original o indirecta si la orientación de las bandas se invierte; el registro en el reporte conserva las características descritas anteriormente.

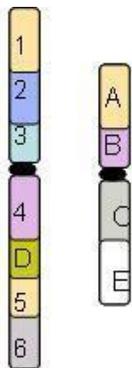


Imagen 2.22. Inserción del segmento identificado con la letra D, entre los segmentos 4 y 5 del cromosoma no homólogo (Contreras et al., 2009). Cortesía de la bióloga Nora Contreras, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

- Inversiones (*inv*): cambio de orientación de un segmento del cromosoma, esta puede comprometer el centrómero por lo que se denomina *pericéntrica*, cuando compromete un segmento de un brazo, respetando el centrómero, se denomina *paracéntrica*. El registro es igual al previsto para las anteriores anomalías.

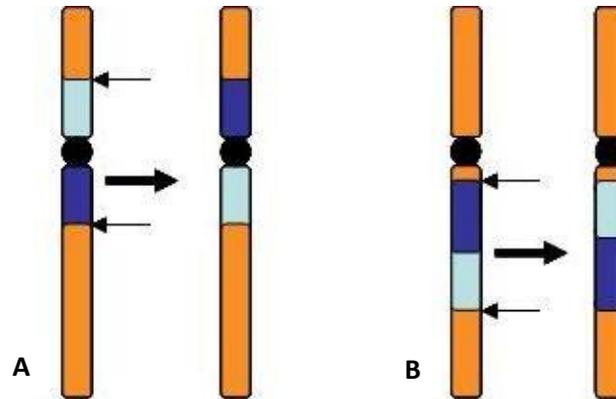


Imagen 2.23. Inversión de segmentos cromosómicos, **A** inversión pericéntrica de cromosoma, se encuentra incluido el centrómero en el segmento invertido; **B** inversión paracéntrica, el segmento que se invierte se encuentra en uno de los brazos del cromosoma, por lo que en centrómero no se encuentra involucrado (Contreras et al., 2009). Cortesía de la bióloga Nora Contreras, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

- Fragilidad (*fra*): sitio en un cromosoma donde ocurre una muesca o una ruptura, luego de la inhibición parcial de la síntesis de ADN; pueden presentarse como variantes de la normalidad sin repercusión fenotípica o poder ser heredados de una forma co-dominante, resultando en anomalías cromosómicas.

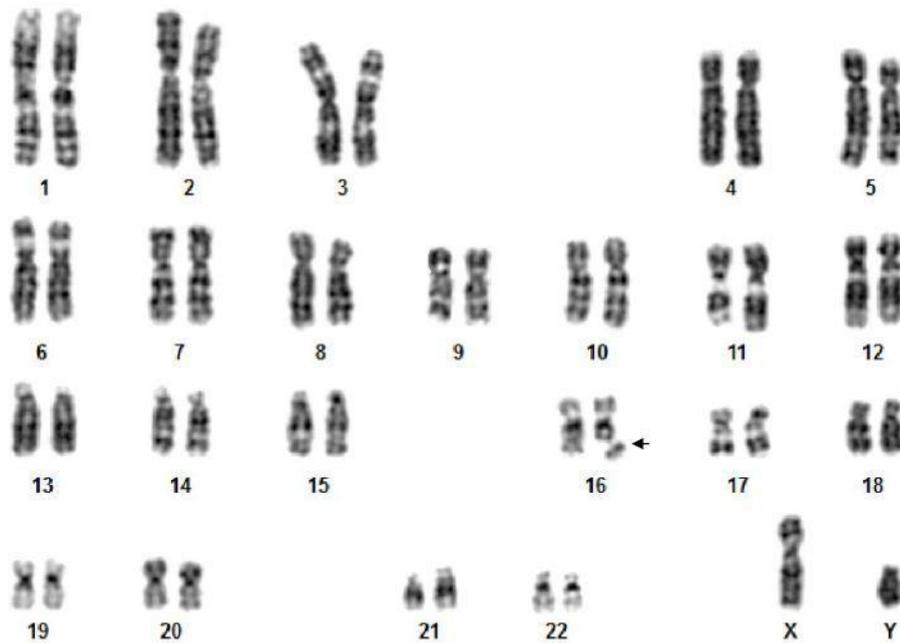


Imagen 2.24. Cariotipo 46,XY,fra(16)(q22), presencia de un sitio de fragilidad cromosómica en el brazo largo del cromosoma 16 a nivel de la banda 22. Cortesía del biólogo Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

- Cromosoma en anillo (*r*): Se forma por la ruptura de los extremos de un cromosoma, los cuales quedan con bordes pegajosos que facilitan su unión para tomar una forma circular.

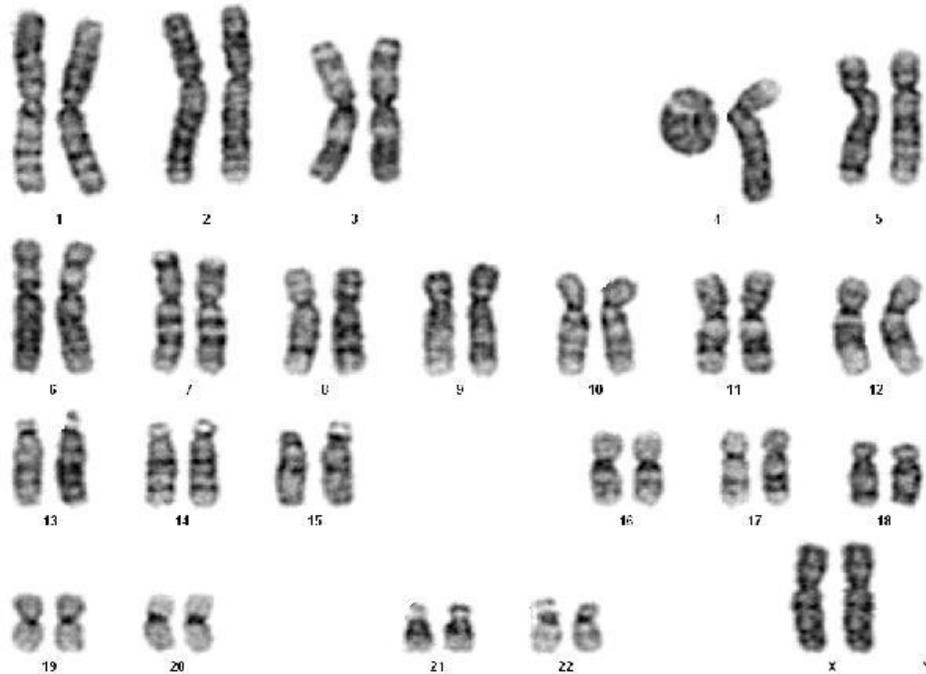


Imagen 2.25. Cariotipo 46,XX,r(4)(p16q35), describe un cariotipo femenino que presenta configuración en anillo del cromosoma 4. Cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá Colombia.

- Cromosomas marcadores (*mar*): se trata de un fragmento cromosómico, el cual no puede ser identificado de forma adecuada por los métodos de bandeamiento citogenético convencional, su registro se hace posterior a registrar el número de los cromosomas y los cromosomas sexuales; en el caso que se presenten otras anormalidades, estas deben ser registradas primero y seguido se debe registrar el signo mas (+), continuando con la abreviatura mar. Ejemplo: 47,XX,+mar cuando es el único hallazgo en el cariotipo; 47,XX,t(12;16)(q13;p11.2),+mar en los casos que se presenten otras anormalidades.

- Translocaciones (*t*): se denomina translocación al intercambio de segmentos entre dos cromosomas, su registro se realiza de la forma descrita anteriormente.

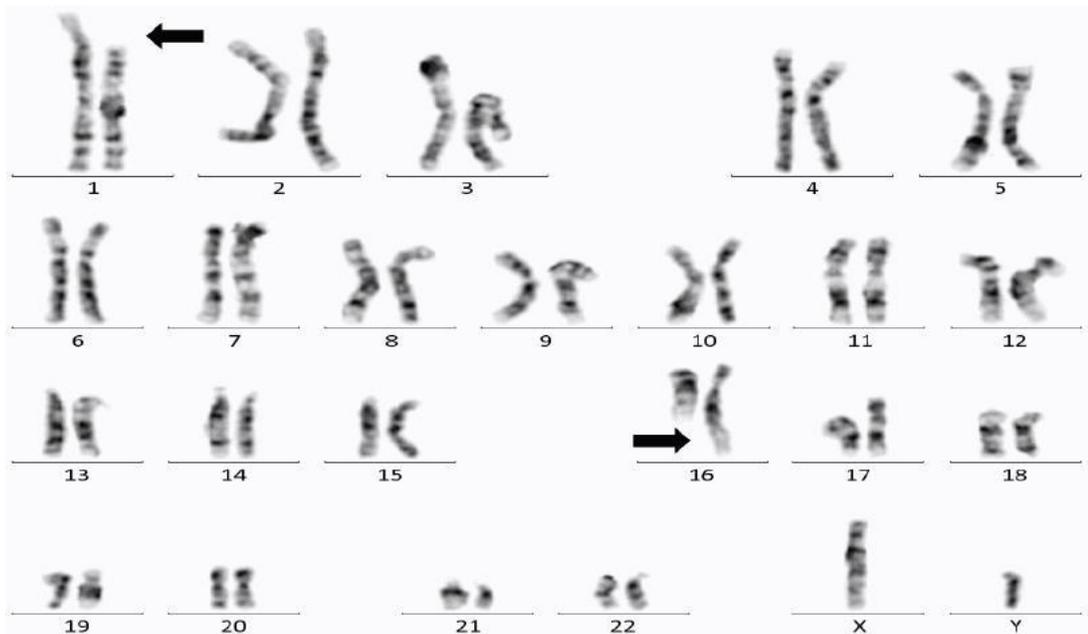


Imagen 2.26. Cariotipo 46,XY,t(1;16)(p33;q24), describe un cariotipo masculino que presenta una translocación recíproca balanceada entre los cromosomas 1 y 16. Cortesía del doctor Carlos Estrada, COLCAN, Bogotá, Colombia.

- Translocaciones Robersonianas (*rob*) o (*der*): se trata de un tipo de translocaciones que se presenta entre cromosomas acrocéntricos (13, 15, 21, 22), su registro se realiza de la misma forma prevista para las deleciones.

2.11. Situaciones especiales con el cariotipo.

La inestabilidad cromosómica se caracteriza por la presencia de daños en el ADN que sobrepasan la capacidad de reparación del mismo, involucrando una ganancia o pérdida de cromosomas completos o parte de ellos (Geigl, Obenauf, Schwarzbraun, & Speicher, 2008); este es un defecto que hace parte de diferentes entidades patológicas, las cuales conforman los síndromes de inestabilidad cromosómicas, dentro de ellos encontramos la anemia de Fanconi, el Síndrome Bloom, la Ataxia Telangiectasia, el Síndrome Nijmegen y el Síndrome Inmunodeficiencia, Inestabilidad Centromérica y Anomalías Faciales (ICF), para los cuales estudios citogenéticos como el análisis de aberraciones cromosómicas inducidas (ACI), el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y desde luego el cariotipo con bandas G (GTG) (Rooney, 2001) han mostrado utilidad para su diagnóstico.

El análisis de aberraciones cromosómicas inducidas (ACI), es un método que evalúa la respuesta de reparación del ADN; en él se exponen las células a agentes mutagénicos, posteriormente se cultivan, seguido de esto se realiza el extendido y la fijación en las láminas porta objetos para finalmente realizar una tinción homogénea y evaluar la presencia de gaps o hendiduras en los cromosomas (Clare, 2012). Para realizar el análisis se efectúa una comparación entre las frecuencias hendiduras observadas en el cultivo analizado y la frecuencia de hendiduras en un cultivo de control proveniente de un individuo sano, el cual se ha sometido a igual tratamiento, se considera positivo el test cuando se ha encontrado frecuencias de hendiduras superiores a 2 veces que las presentadas en el control (OECD, 2014).

A través del análisis de aberraciones cromosómicas inducidas, se realiza el diagnóstico citogenético de la anemia de Fanconi, la cual requiere la visualización de la anomalía en al menos 50 metafases, siendo óptimo 100 metafases. Además la ataxia telangiectasia utiliza esta técnica; el diagnóstico se hace con la presencia del defecto en 50 – 100 metafases, sin embargo algunos

pacientes con esta entidad muestran una respuesta intermedia o nula a la radiación, por tal motivo se hace necesario el análisis de 50 metafases para rearreglos que involucren los loci del receptor de antígeno de célula T en los cromosomas 7 y 14 (Hastings et al., 2012b); el Síndrome Nijmegen también puede ser diagnosticado a través del análisis de aberraciones cromosómicas inducidas, es necesario el análisis entre 80 – 100 metafases teniendo especial atención en el análisis de los cromosomas 7 y 14 (CCMG Cytogenetics Committee, 2010).

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH), es un método que utiliza la bromodeoxiuridina (BrdU) que es un análogo de la tiamina, para que se incorpore a la cadena de ADN recién sintetizada durante la replicación; durante un primer ciclo celular se obtiene un sola cadena que incorporó la BrdU, en el segundo ciclo celular, se presenta el intercambio de material genético entre ambas cromátidas tanto la cadena que incorporó BrdU como la que no lo tiene incorporado; en este punto, las células son tratadas con Hoechst 33258, expuestas a calor y luz y finalmente teñidas con Giemsa (Escribano R., Castillo T., Daher N., Salazar C., & Tobella P., 2009). De esta forma se logra una tinción intensa sobre los cromosomas que tiene incorporada la BrdU, así como los segmentos que se intercambiaron con las cromátidas hermanas, lo cual es útil para el diagnóstico del síndrome Bloom, entidad en la cual se ven marcadamente aumentadas estas recombinaciones, por tal motivo es necesario evaluar 20 metafases para confirmar el aumento del número de recombinaciones (CCMG Cytogenetics Committee, 2010). El cuadro 2.1 resume algunas condiciones que requieren un análisis citogenético especial.

Condición evaluada	Método de análisis	Características del análisis
Síndromes de inestabilidad cromosómica	Aberraciones cromosómicas inducidas	Anemia de Fanconi, analizar de 50 – 100 metafases
		Síndrome Ataxia-telangiectasia analizar de 50 – 100 metafases
		Síndrome Nijmegen analizar de 50 – 100 metafases
	Intercambio de cromátidas hermanas	Síndrome Bloom analizar de 20 metafases
Síndromes dismórficos (inestabilidad centromérica)	Cariotipo bandeado C	Síndrome Roberts analizar de 50 metafases
	Cariotipo	Síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales) analizar de 50 metafases, en regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9 y 16
Mosaicos	Cariotipo	Muestras postnatales analizar mínimo 30 metafases
	Cariotipo	Muestras prenatales analizar 2 o 3 cultivos de forma independientes para confirmar los hallazgos.

Tabla 2.1 Condiciones que requieren análisis citogenético especial, adaptado de (CCMG Cytogenetics Committee, 2010).

Otra de las situaciones especiales que obligan a un análisis específico de metafases son las patologías oncológicas, en este caso se debe realizar un análisis diagnóstico y un seguimiento post tratamiento; a continuación se mencionan las características que debe ser tenidas en cuenta en el reporte citogenético.

TIPO DE MALIGNIDAD	Leucemia mieloide crónica y enfermedades mieloproliferativas crónicas	Leucemia aguda y mielodisplasia	Neoplasias de células B maduras, linfoma maligno y tumores solidos
METAFASES ANALIZADAS Diagnostico	Mínimo 10 para confirmar la presencia de clones anormales y valoración pre trasplante. Analizar 20 si es normal.	Mínimo 10 para confirmar la presencia de clones anormales y valoración pre trasplante. Analizar 20 si es normal, o si la presencia de evolución clonal es significativa. En caso de confirmar leucemia linfoide aguda pediátrica pre células B, se realizan análisis extensos.	Mínimo 10 para confirmar la presencia de clones anormales y valoración pre trasplante. Analizar 20 si es normal.
METAFASES ANALIZADAS Post tratamiento	Mínimo 10 para confirmar la presencia del clon anormal original. Analizar 25 si es normal.	Mínimo 10 para confirmar la presencia del clon anormal original. Analizar 25 si es normal.	Mínimo 10 para confirmar la presencia del clon anormal original. Analizar 25 si es normal.

Tabla 2.2 situaciones especiales en oncología. adaptado de (CCMG Cytogenetics Committee, 2010).

2.12 Variantes del cariotipo

2.12.1 Cariotipo espectral *Spectral Karyotyping (SKY)*

El cariotipo espectral (SKY), surgió a finales de la década de 1990s a partir de los métodos de hibridación con fluorescencia, con el propósito de cribar alteraciones cromosómicas en el genoma completo (Schröck et al., 1996); este método consiste en la visualización simultanea de los 24 cromosomas humanos a través de una imagen espectral, que resulta de la completa marcación de

estos con sondas unidas a fluorocromos, las cuales son hibridados durante la metafase cromosómica (Garini et al., 1996).

Luego de su marcación, los cromosomas son ubicados en una lámina porta objeto para ser visualizados por medio un microscopio que combina un dispositivo de carga acoplada, y la espectroscopia de Fourier para generar una imagen espectral (Schröck et al., 1996) que surge a partir de la diferencia entre señales lumínicas que son detectadas por un interferómetro y que posteriormente son analizadas a través de algoritmos específicos incorporados en un sistema computarizado (Anguiano et al., 2012).

El SKY es útil en la identificación de translocaciones *de novo* balanceadas y no balanceadas, así como citogenética comparativa e identificando re arreglos cromosómicos (Garini et al., 1996); es capaz de identificar rearrreglos complejos con una sensibilidad entre el 88 – 100%, anormalidades estructurales con una sensibilidad cercana al 100%, así como cromosomas marcadores con una sensibilidad del 77%; adicionalmente el SKY permite una adecuada identificación de mosaicismo menores del 20% (Anguiano et al., 2012)

2.13 Hibridación *In Situ* Con Fluorescencia (FISH)

La hibridación fluorescente *In situ* (abreviado en Inglés como FISH), es un método citogenético que combina el análisis citológico de los cromosomas con un análisis molecular basado en sondas de ADN (C. N. Lee et al., 2012). Es útil para detectar alteraciones de los cromosomas en las que hay pérdida o ganancia de material genómico y también, para fusiones cromosómicas. Se realiza directamente sobre el tejido o la célula de interés (tumor fijado en parafina, espermatozoides o material de aborto) (Gerami & Zembowicz, 2011), o también en células cultivadas en el laboratorio (linfocitos de la sangre, fibroblastos de la piel o del líquido amniótico, etc.).

La FISH aprovecha el apareamiento y la complementariedad entre las bases nitrogenadas. Como es conocido, para el ADN, la unión entre los nucleótidos adenina y timina ocurre mediante dos puentes de hidrógeno (A=T), mientras que la unión entre guanina-citosina ocurre mediante tres (C≡G); para el caso del ARN, la unión ocurre entre adenina y uracilo (A=U) y se presenta mediante dos puentes de hidrógeno, para C≡G ocurre de la misma manera que en el ADN (Bauman, Wiegant, & van Duijn, 1981). El método requiere la desnaturalización de las bases nitrogenadas para luego colocar una sonda de ADN de cadena sencilla que es complementaria a la secuencia de análisis y que tiene una longitud que varía entre 50 a 150 bases del ADN o ARN. Esta sonda compite en la hibridación con el ADN nativo, a la cual se le conjuga un anticuerpo específico (K. H. Cox, DeLeon, Angerer, & Angerer, 1984), que a su vez, ha sido marcado con un fluorocromo que se ilumina químicamente al completarse la reacción de hibridación de la sonda con la región de interés (Mallmann et al., 2010). A través de esta técnica es posible detectar una gran variedad de secuencias en el genoma, como secuencias únicas de ADN, secuencias repetitivas, estudiar brazos enteros de cromosomas o incluso, el cromosoma completo (Yamada et al., 2011).

El proceso para la realización de la FISH incluye:

- la selección de una sonda que contiene una secuencia complementaria a la secuencia de interés en el ADN. Actualmente hay disponibles sondas para un *locus* específico, sondas para repeticiones centroméricas y sondas para cromosomas completos (Brown, Gersen, Anyane-Yeboah, & Warburton, 1993).
- Si bien existen sondas marcadas con isótopos radioactivos como ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P que se revelan mediante una autoradiografía, lo común es que estén marcadas con señales fluorescentes, como fluoresceína, mediante métodos directos (Dirks et al., 1991) o indirectos que usan un segundo anticuerpo (Bauman et al., 1981). Otros métodos indirectos

de FISH utilizan digoxigenina (DIG), la cual se une a la uridina o la biotina y son detectados por anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina, fluoresceína o rodamina (Langer, Waldrop, & Ward, 1981).

- preparación de la placa que contiene la muestra de interés
- pretratamiento de la placa
- denaturación de la sonda y del blanco de interés
- hibridación
- lavado
- análisis e interpretación al microscopio de luz ultravioleta usando filtros especiales

(Mascarello et al., 2011)

Sonda de secuencia única o copia simple	Detección de secuencias en regiones subteloméricas
Sonda centromérica	Detección de secuencias altamente repetitivas en regiones peri-centroméricas
Sonda de secuencias para regiones específicas	Detección de regiones repetitivas en regiones específicas dentro del cromosoma
Sondas para el pintado de cromosomas completos	Detectan secuencias de eucromatina y se usa en la caracterización de rearrreglos en secciones o el cromosoma completo

Tabla 2.3 Tipos de sondas para FISH utilizadas en el diagnóstico de deleciones, duplicaciones o fusiones cromosómicas. Modificado de (Gersen & Keagle, 2005).

El análisis de las muestras se realiza bajo el microscopio con luz ultravioleta con el uso de filtros especiales que permiten visualizar los fluorocromos que brillan a distintas longitudes de onda (Mery, Parra, Gollop, & Naccache, n.d.), (Volpi & Bridger, 2008).

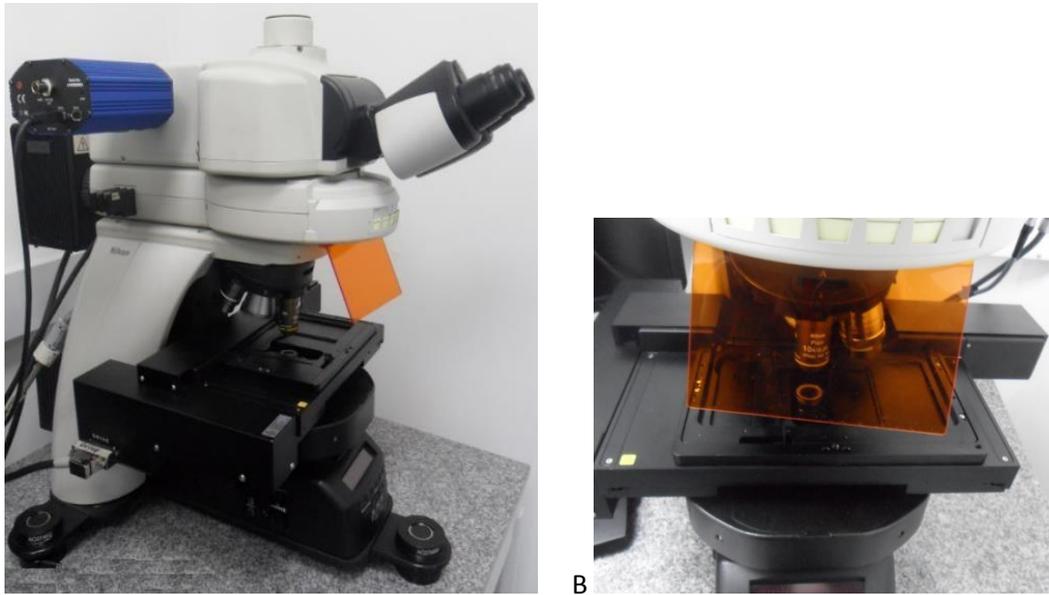


Imagen 2.27. **A.** microscopio óptico equipado con filtros para fluorescencia para la detección de sondas marcadas y **B.** filtro de protección contra luz ultravioleta. Cortesía del Centro de Investigación en Genética y Genómica de la Universidad del Rosario (CIGGUR), Bogotá, Colombia.

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Color
DAPI	358	461	Azul
DEAC	426	480	Turquesa
FITC/R110	494/500	517/525	Verde
R6G	524	550	Amarillo
TAMRA/Cy3	552/550	575/570	Naranja
TexRed/Cy3.5	590/581	612/596	Rojo
Cy5	649	670	Cercano a infrarrojo
Cy5.5	675	694	Infrarrojo
Cy7	743	767	Infrarrojo

Tabla 2.4 Listado de algunos de los fluorocromos más utilizados en FISH, se indican las longitudes de onda en nanómetros (nm), para excitación y emisión y los colores que representan.

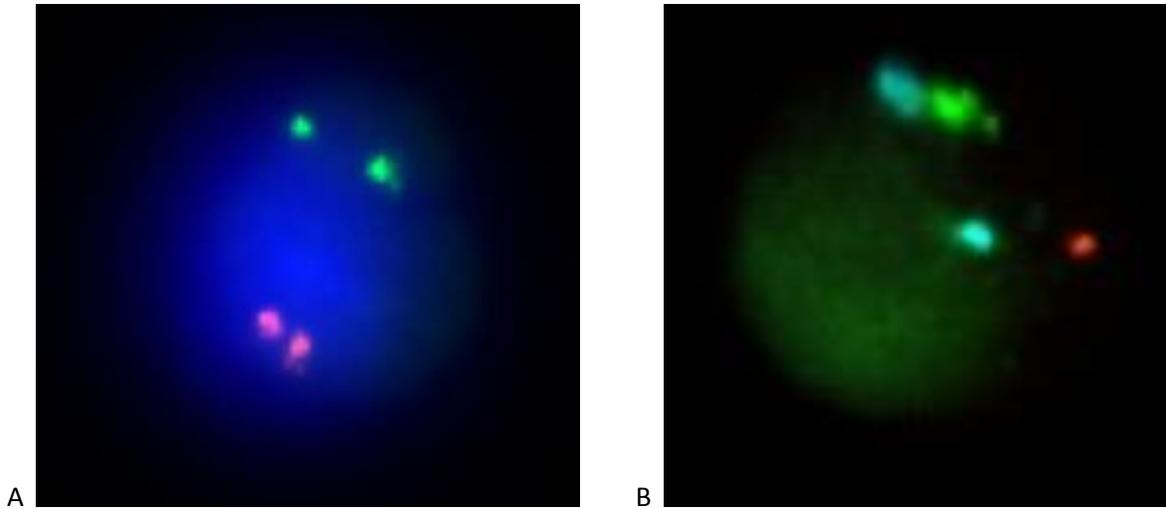


Imagen 2.28. Sondas sitio-específicas para identificación de los cromosomas 13, 18, 21, y los cromosomas sexuales X y Y. en la imagen **A**. se puede apreciar 2 cromosomas 21 identificados por la hibridación de una sonda con fluorocromo rojo y dos cromosomas 13 identificados por la hibridación de 2 sondas con fluorocromo verde. En la imagen **B** se aprecia 2 cromosomas 18 identificados por las sondas de color azul claro, un cromosoma X identificado por la sonda de color verde y el cromosoma Y, identificado por la sonda de color rojo. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia

Las aplicaciones clínicas de la FISH (tablas 2.5 y 2.6) dependen de la sensibilidad del método y están limitadas al tamaño de las alteraciones cromosómicas, con una resolución mínima de hasta 1,5 a 2 Mb, (GeneDx, 2013; Morris & Mervis, 2000)

SÍNDROMES DE MICRODELECIÓN			
SÍNDROME	DELECIÓN	SONDA	FENOTIPO
Angelman	15q11.2– 15q13	SNRPN, D15S10	Retardo mental severo, hipotonía, ataxia, pérdida del habla, hipopigmentación, convulsiones, risa inmotivada, características dismórficas
DiGeorge	22q11.2	D22S75	Características dismórficas, cardiopatía congénita, ausencia de timo, falla en el crecimiento, déficit cognitivo.
Miller-Dieker	17p13.3	LIS1	Retardo mental severo, lisencefalia, características dismórficas.
Prader-Willi	15q11.2– 15q13	SNRPN	Retardo mental, hipotonía, dificultad para la deglución, hiperplasia genital, obesidad, hiperfagia, características dismórficas.
Smith- Magenis	17p11.2	SHMT1, TOP3, FLI1,LLGL1	Retardo mental, retardo en el lenguaje, comportamiento bizarro, neuropatía periférica, características dismórficas.
Velocardiofacial	22q11.2	TUPLE1	Retardo en el desarrollo, deficiencia faríngea, facies anormales, defectos palatinos, defectos cardíacos congénitos.
Williams-Beuren	7q11.2	ELN	Retardo mental, hipercalemia, personalidad gregaria, enfermedad cardíaca congénita.
Neuropatía Hereditaria con Parálisis debida a la Presión (HNPP: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies)	17p11.2p11.2	LIVE 17p12	Disfunción recurrente sensorio-motora simétrica suscitada por traumas menores, adelgazamiento de la mielina con neuropatía generalizada, electromiografía con patrón neuropático.
Wolf-Hirschhorn	4p15		Retardo mental, microcefalia, convulsiones, hipotonía, deficiencia inmunológica, hipoacusia, defectos cardíacos y defectos genitourinarios.
Cri-du-chat	5p15	EN5	Microcefalia, llanto similar a maullido de gato, retraso psicomotor severo, características dismórficas.

SINDROMES DE MICRODUPLICACION			
Charcot-Marie-Tooth 1A	17p11.2– PMP22	LiVe 17p	Debilidad y atrofia muscular distal, pie cavo, dedos en martillo, hipoacusia, disminución de las velocidades de neuroconducción en la electromiografía.
Pelizaeus-Merzbacher	PLP		Debilidad muscular, nistagmus, retraso en el desarrollo psicomotor, espasticidad y movimientos coreiformes

Tabla 2.5 Algunos de los síndromes de Microdelección o Microduplicación Cromosómica identificados por FISH. Modificado de (Gersen & Keagle, 2005; Wolff et al., 2007)

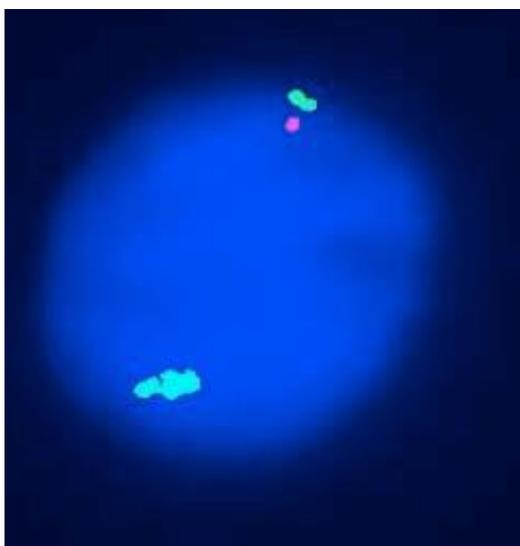


Imagen 2.29. Nuc ish (D7Z1x2, ELNx1), prueba de FISH para delección en el cromosoma 7 (síndrome Williams-Beuren); la imagen muestra dos señales verdes que corresponden a la sonda D7Z1, que hibrida en la región 7p11.1-q11.1 y que actúa como sonda de control normal y muestra una sola señal roja que corresponde a la sonda ELN, la cual hibrida en la región 7q11.23, que es la región crítica para el síndrome Williams-Beuren. La imagen confirma la pérdida (delección) de la región 7q11.23 y el resultado confirma el síndrome Williams-Beuren. Cortesía del doctor Carlos Estrada, COLCAN, Bogotá, Colombia.

PATOLOGIA	HALLAZGO CITOGENETICO
Leucemia mieloide aguda	t(8;21), t(15;17), inv(16)
Leucemia mieloide crónica	t(9;22)
Leucemia linfoblástica aguda precursora de células B	t(1;19), t(?;11), t(9;22)
Leucemia linfocítica crónica	del(13q14), del(11q22), del(17q13)
Mieloma de células plasmáticas	del(13q14), hiperploidia, t(4;14)
Leucemia eosinofílica crónica	del(4q12)
Síndrome deleción 5q	del(5q)

Tabla 2.6 principales malignidades hematológicas diagnosticables a través de FISH, modificado de (Wolff et al., 2007).

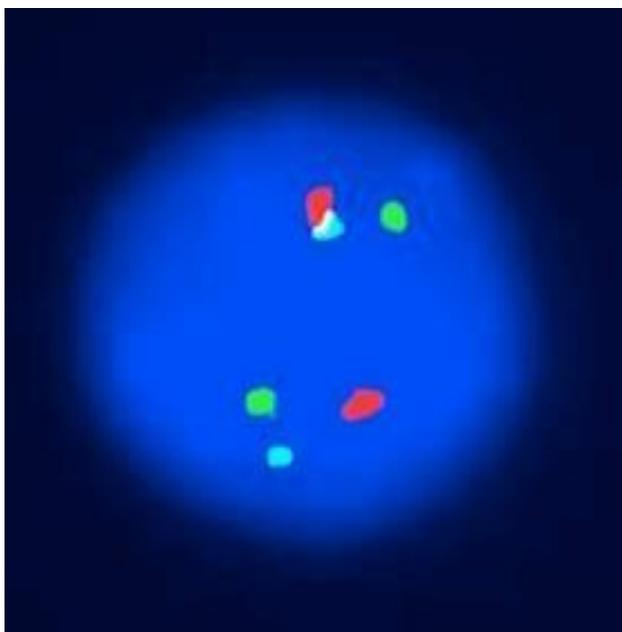


Imagen 2.30. Nuc ish (EGR1, RPS14, 5p15), Prueba de FISH para deleción 5q (síndrome mielodisplásico), la imagen muestra dos señales rojas que corresponden a la sonda EGR1 que se hibrida en la región 5q31.2, dos señales verdes que corresponden a la sonda RPS14 que hibrida en la región 5q32-33 y dos señales azules correspondientes a la sonda 5p15, que hibrida en su región

homóloga y actúa como control. La imagen muestra un FISH normal, descartando la delección del brazo largo del cromosoma 5. Cortesía del doctor Carlos Estrada, COLCAN, Bogotá, Colombia.

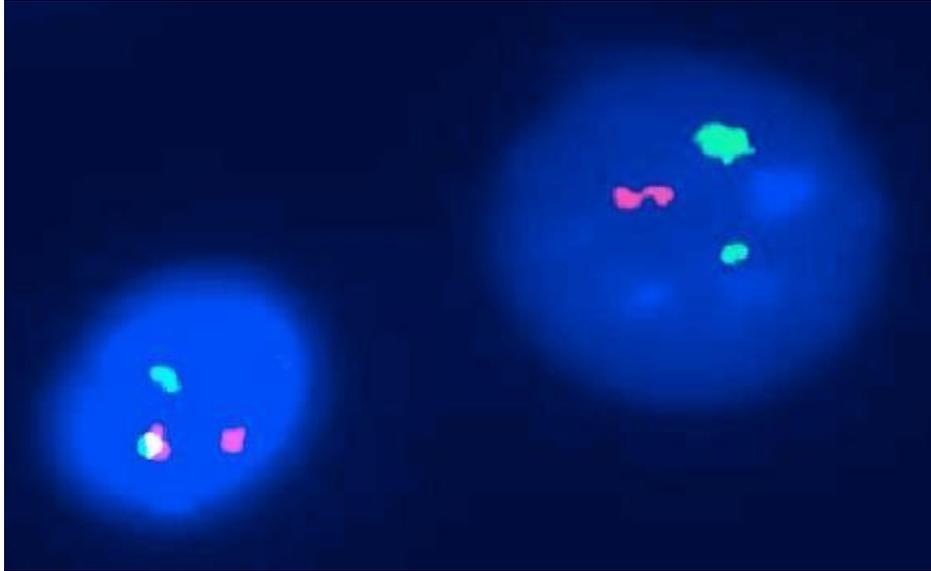


Imagen 2.31. Nuc ish (ABL,BCR)x2[86/100]/(ABL1,BCR)x2(ABL1conBCR)x1[14/100]. Prueba de FISH BCR/ABL para translocación 9;22 (Leucemia Linfocítica Aguda –LLA-), la imagen de la derecha muestra dos señales naranjas que corresponden a la sonda ABL1 que hibrida en la región homóloga localizada en el locus 9q34 y dos señales verdes que corresponden a la sonda BCR que hibrida en la región 22q11, este patrón está presente en 86 de 100 células evaluadas; adicionalmente se evidencia la yuxtaposición de las sondas naranja y verde, lo que indica una translocación entre los cromosomas 9 y 22, que puede estar en relación con LLA. Esta yuxtaposición estuvo presente en 14 de 100 células analizadas. Cortesía del doctor Carlos Estrada, COLCAN, Bogotá, Colombia.

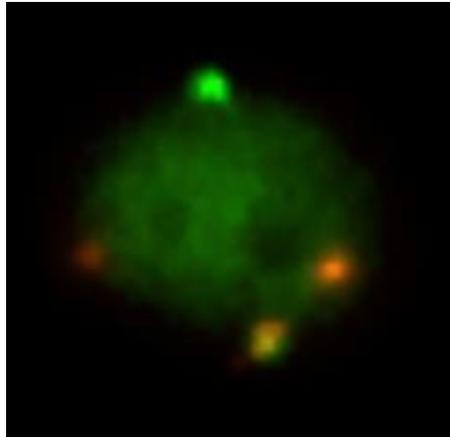


Imagen 2.32. Prueba de FISH para translocación de los cromosomas 15;17 (*PML/RARA*) presente en la leucemia promielocítica y en leucemia mieloide aguda. La imagen en la parte inferior del núcleo muestra la fusión de los genes *PML* identificado con la sonda verde y el gen *RARA* identificado con la sonda de fluorescencia roja, en un caso de leucemia promielocítica Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

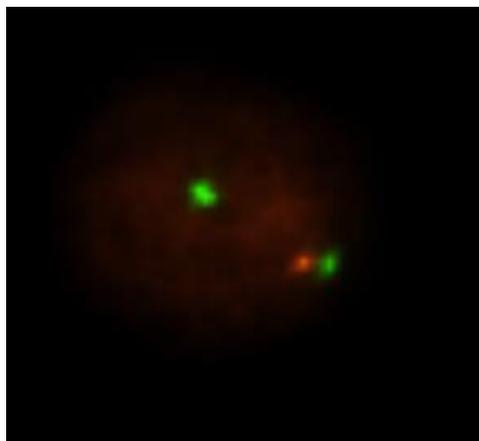


Imagen 2.33. Prueba de FISH para delección del gen *P53* localizado en 17q13, presente en leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple. La imagen muestra la ausencia de una señal de fluorescencia roja que evidencia la delección del gen *P53*; la sonda de fluorescencia verde corresponde al control el cual se hibrida en el centrómero del cromosoma 17. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

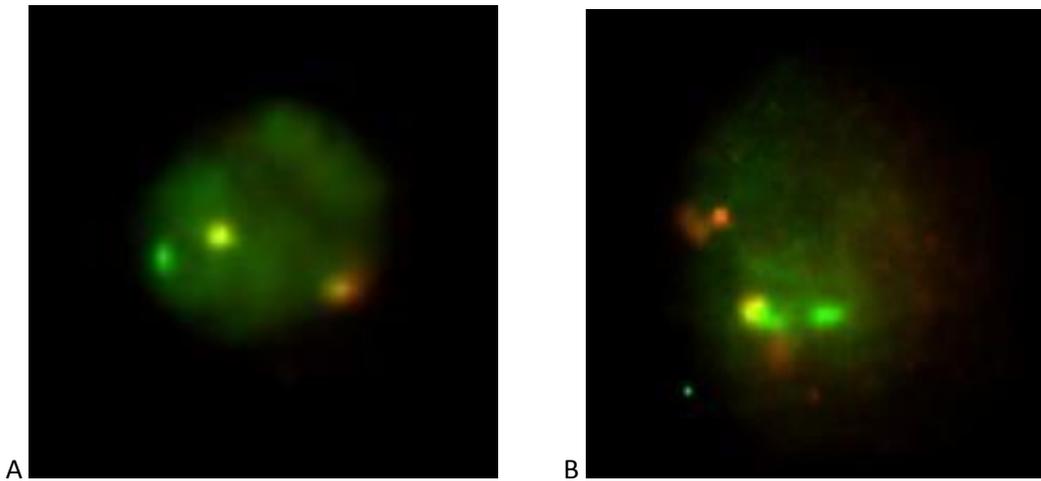


Imagen 2.34. Prueba de FISH para translocación 4;14 (*IGH/FGFR3*) presente en mieloma de células plasmáticas. Las imágenes **A** y **B** muestran la fusión del gen *IGH* identificado con la sonda verde y localizado en 14q32.33, con el gen *FGFR3* localizado en 4p16.3 e identificado con la sonda naranja. Cortesía del doctor Juan Javier López, Clínica Colombia, Colsanitas, Bogotá, Colombia.

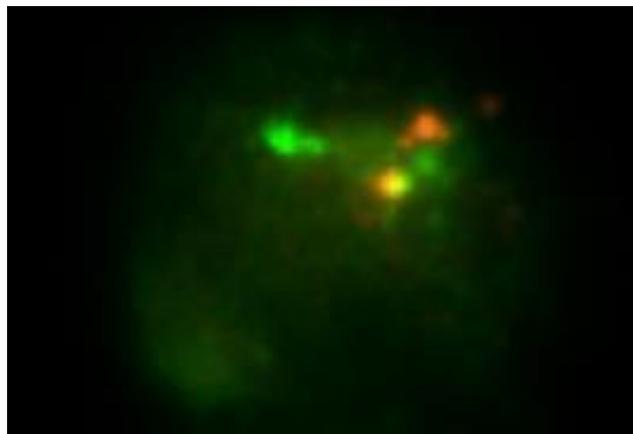


Imagen 2.35. Prueba de FISH para translocación 14;16 (*IGH/MAF*) presente en mieloma múltiple; la imagen muestra la fusión entre el gen *IGH* identificado con la sonda de fluorescencia verde,

localizado en 14q32.33 con el gen *MAF* localizado en 16q23 e identificado con la sonda de fluorescencia naranja , cortesía del doctor Javier López laboratorio especializado Clínica Colombia.

2.13.1 Análisis convencional

El análisis de FISH estudia rutinariamente más de un objetivo; sin embargo, para los casos en los que se analiza un *locus*, se hace necesario el uso de una segunda sonda (Mascarello et al 2011), que sirve de control interno que controla la eficacia de la hibridación. Las aplicaciones clínicas que tiene el FISH son amplias, siendo las tres áreas de mayor aplicación: el diagnóstico de pacientes con defectos congénitos y retraso mental, el diagnóstico y cribado prenatal y la identificación y monitorización de anomalías cromosómicas adquiridas en leucemia y cáncer; esto debido a la flexibilidad de análisis tanto de células en metafase, como en muestras que contengan núcleos de células en interfase (Wiktor et al 2011).

2.13.2 Análisis de células en metafase por FISH

Para que el método sea exitoso requiere en cada caso una adecuada hibridación de las sondas objetivo y de control (*target probe*). La sensibilidad y especificidad es cercana al 100% cuando la hibridación es adecuada y se confirma en más de 40 cromosomas, para lo cual es necesario evaluar, al menos 20 células en metafase, cuando se realiza el análisis en autosomas y 40 metafases cuando el análisis es para los cromosomas sexuales (Mascarello et al 2011).

Para el análisis de una microdelección en una célula en metafase, ésta debe observarse en no menos de 10 células; si hay discordancia entre los resultados de las metafases, se debe realizar el análisis de 10 células adicionales. Cuando se observan núcleos de células en interfase, por ejemplo microdelecciones, microduplicaciones o aneuploidias, es necesario evaluar por lo menos 25 núcleos de la muestra en estudio por 2 observadores independientes; en el caso en que este análisis sea discordante y requiera de una tercera evaluación, se recomienda el análisis de al menos 50 núcleos por este nuevo perito.

2.13.3 Análisis de células en interfase por FISH

La FISH en células con núcleos en interfase debe incluir el estudio de no menos de 25 núcleos (Mascarello et al., 2011), de la misma forma que se hace para las células en metafase; cuando se identifica un posible mosaico o en los casos de posible quimerismo debe aumentarse el análisis a 100 núcleos (Hastings, Howell, Bricarelli, Kristoffersson, & Cavani, 2012a). La prueba debe ser adelantada por un analista y verificada por un supervisor, quien revisará entre el 30 y el 70% del total de las células previamente estudiadas; de encontrarse discrepancias entre observadores, éstas deben ser resueltas por un tercer analista.

Como se mencionó anteriormente, la FISH puede ser realizada en diferentes tipos de muestra; una de las aplicaciones más frecuentes de esta prueba es el análisis de tejidos de tumores sólidos. Los tejidos tumorales en su gran mayoría estarán embebidos en un bloque de parafina, lo que permite la preservación de la arquitectura de la muestra (Wan & Ma, 2011). No obstante en los tumores en bloques de parafina, por el método de corte, son frecuentes los núcleos truncados y otros artefactos que disminuyen la eficiencia de la hibridación y limitan la detección de un mosaicismo de bajo nivel o enfermedad residual mínima (Mascarello et al., 2011).

Para la FISH de muestras embebidas en parafina un médico patólogo debe identificar y delimitar las células normales de las patológicas (Mascarello et al., 2011; Z. Shi, Johnson, & Stack, 2012), luego de lo cual se verifica la hibridación sobre las células de todas las sondas (de control y problema), hasta completar por lo menos 50 núcleos si el tumor presenta uniformidad en los resultados; en los casos de heterogeneidad genética, se deberán valorar 100 núcleos y por dos observadores independientes (Koide, Sakakura, Takahashi, Abe, & Inazawa, 1997).

2.13.4 Modificaciones de la técnica de FISH

Desde su introducción se han realizado cambios al método original de FISH, sea éste usado como prueba de investigación o de diagnóstico (Tsuchiya, 2011). Para el diagnóstico se pueden destacar M-FISH (Multiplex-FISH), FIBER-FISH, Flow FISH, los cuales se describirán a continuación.

2.13.4.1 MULTIPLEX-FISH (M-FISH)

Este método se basa en pintar por completo cada cromosoma con un color específico, para lograr pintar los 24 cromosomas es necesario la combinación de 5 fluorocromos (Azofeifa et al., 2000) que se combinan en una variedad de tinciones y colores que se estudian mediante un *software* que ayuda a identificar rearrreglos complejos en tejidos neoplásicos, el origen de duplicaciones y de cromosomas marcadores o bien para la detección de rearrreglos crípticos. El M-FISH tiene una resolución de entre 1 y 3 Mb (Fan, Siu, Jung, & Xu, 2000), sin que se puedan detectar cambios de menor tamaño a 1 Mb.

2.13.4.2 FIBER-FISH

Es un método que permite el ordenamiento físico de sondas de ADN que tienen resolución inferior a 3.000 pb y se utiliza para la detección de brechas o solapamiento de regiones genómicas. El método se basa en la liberación y la captura de las hebras de ADN del núcleo, por medio de buffers alcalinos o soluciones hipertónicas, para luego fijarlas en una lámina portaobjetos y realizar la respectiva hibridación con las sondas específicas (Raap et al., 1996)

2.13.4.3 FLOW FISH

La FLOW FISH incorpora la citometría de flujo al análisis con FISH y tiene la mayor utilidad en la medición de la longitud de los telómeros. El método incorpora ácidos nucleicos peptídicos (PNA) marcados con sondas, creando interacciones PNA-DNA que son más estables que las de sondas de ADN o ARN (Lansdorp et al., 1996; Siddiquee, Rovina, & Azriah, 2015); posteriormente se utiliza citometría de flujo para cuantificar el número de copias repetidas del ADN, de esta manera determinar la longitud de los telómeros en cada cromosoma, detectando variación de la longitud de 2 a 10 kb (Baerlocher, Vulto, de Jong, & Lansdorp, 2006)

2.13.5 Limitaciones de la FISH

Dentro de las limitaciones que se pueden mencionar en el análisis citogenético a través de FISH, se encuentra la necesidad de sondas específicas para cada región que se desea estudiar, por lo que solo se pueden analizar regiones con secuencias conocidas; la limitación para la hibridación de sondas en muestras embebidas en parafina y, por último, la limitación para la detección de

rearrreglos con un tamaño menor de 1.5 Mb en el FISH clásico y menores de 1 Kb en las variantes de FISH.

Se puede concluir que la hibridación *in situ* con fluorescencia es una técnica versátil y rápida que se puede aplicar en el ámbito diagnóstico, no solo de padecimientos genéticos de tipo hereditario o “*de novo*”, en neoplasias y en el diagnóstico prenatal. Se puede aplicar en células de cultivo, en núcleos de células en interfase y en células provenientes de muestras anatomo-patológicas. Es importante resaltar que la utilidad de la FISH está en la detección precisa de rearrreglos como microdeleciones o microduplicaciones, así como la identificación de material genético desconocido (cromosomas marcadores); que se han realizado variaciones en el método que permiten identificar la longitud telomérica o estimar en número de copias, como en el caso del M-FISH o del FLOW-FISH, entre otros. El FISH adiciona un mayor nivel de resolución y detalle comparado con el diagnóstico cromosómico convencional.

2.14 Análisis de microarreglos cromosómicos

El análisis de microarreglos cromosómicos (en inglés *chromosomal microarray analysis o comparative genomic hybridization –CMA o CGH-*) es un método de citogenética molecular que permite identificar la ganancia o la pérdida de material genético, analizando simultáneamente los 23 pares de cromosomas humanos por medio de una plataforma que combina dos métodos: la hibridación genómica comparada (CGH) y el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (Haeri, Gelowani, & Beaudet, 2016).

La CGH detecta ganancias o pérdidas de material genético al poner en contacto una mezcla de ADN del paciente contra un ADN de referencia, ambos marcados con un fluoróforo distinto. Esto sucede

al interior de un bio-chip que contiene una serie de sondas que se unen a regiones específicas de los cromosomas; la mezcla de ambas tinciones muestra una cantidad equilibrada en la señal emitida por el material genético combinado del ADN del paciente y el de referencia; por el contrario, la disminución o aumento del nivel de tinción de uno de los fluoróforos en el ADN del paciente será el reflejo de la pérdida o ganancia de material genético por este, con lo cual se pueden detectar tanto monosomías como trisomías de cromosomas completos o parciales a lo largo del genoma.

El uso de un arreglo CGH mejora la resolución de la citogenética convencional (cariotipo), que solo tiene una resolución hasta 5 Mb (megabases), alcanzando un rango de detección de cambios en el número de copias hasta aproximadamente 400 kb (kilobases). Esto indica que un array CGH provee un aumento sustancial de la resolución de más de diez veces sobre la resolución que alcanza el cariotipo convencional con bandeado G, y facilita la detección de casi todos los síndromes de microdelección o microduplicación cromosómica (Miller et al., 2010).

El arreglo CGH permite identificar defectos genómicos patogénicos en aproximadamente el 15% de los afectados por déficit intelectual, retardo en el desarrollo, defectos del espectro autista o anomalías congénitas múltiples (rango entre 10% - 20%), que han presentado resultados normales en las pruebas de un cariotipo convencional (Miller et al., 2010; Sahoo et al., 2009). La mayor resolución se debe también a la posibilidad del análisis de regiones peri-centroméricas y sub-teloméricas, las cuales usualmente escapan del análisis cuando se utilizan métodos citogenéticos clásicos.

Las limitaciones del arreglo CGH es la dificultad para detectar rearrreglos balanceados en el genoma como translocaciones, inserciones o inversiones; además, no logra identificar la mutación de un solo par de bases o los rearrreglos en el genoma mitocondrial; en adición, el arreglo CGH no identifica mosaicismos cromosómicos menores al 10% (Tao et al., 2014)

El análisis de las variaciones de secuencia de un nucleótido o SNPs a lo largo de todo el genoma es una de las mayores fuentes de variabilidad, dado que en promedio uno de cada 600 nucleótidos presenta variación (un sitio de SNP) (Catsburg et al., 2007). El análisis CMA evalúa regularmente 2 millones de SNPs distintos en cada persona y establece una relación entre el SNP y las regiones vecinas; por consiguiente, la ausencia de uno o más SNPs asociados a un alelo determinado señalan la ausencia de esa región. Por el contrario, el aumento en el número de copias de SNPs de una región cromosómica, son evidencia de una duplicación (Lu et al., 2007).

A partir de 2010 el colegio americano de genética médica *American College Of Medical Genetics – ACMG-*, recomendó las pruebas de rearrreglos cromosómicos debe ser aplicada como primera línea diagnóstica en personas que presenten: 1. Múltiples anomalías que no sean específicas de un síndrome bien definido, 2. Discapacidad intelectual y/o retraso en el desarrollo aparentemente no sindrómicos y 3. Desórdenes del espectro autista. Así mismo, sugieren realizar una confirmación de los resultados por un segundo método, junto con la evaluación de los padres que incluya una adecuada evaluación clínica y asesoramiento genético (Manning & Hudgins, 2010).

Se debe tener en cuenta que de acuerdo con la cantidad de oligos disponibles para análisis en el array, CMA tiene una resolución final mínima entre 30 Kb a 180 kb para todo el genoma y de hasta 5 kb para regiones blanco; así mismo es relevante recordar que este método no detecta rearrreglos cromosómicos balanceados como inversiones o translocaciones ni la naturaleza estructural del mismo (Wain & Thorland, 2011).

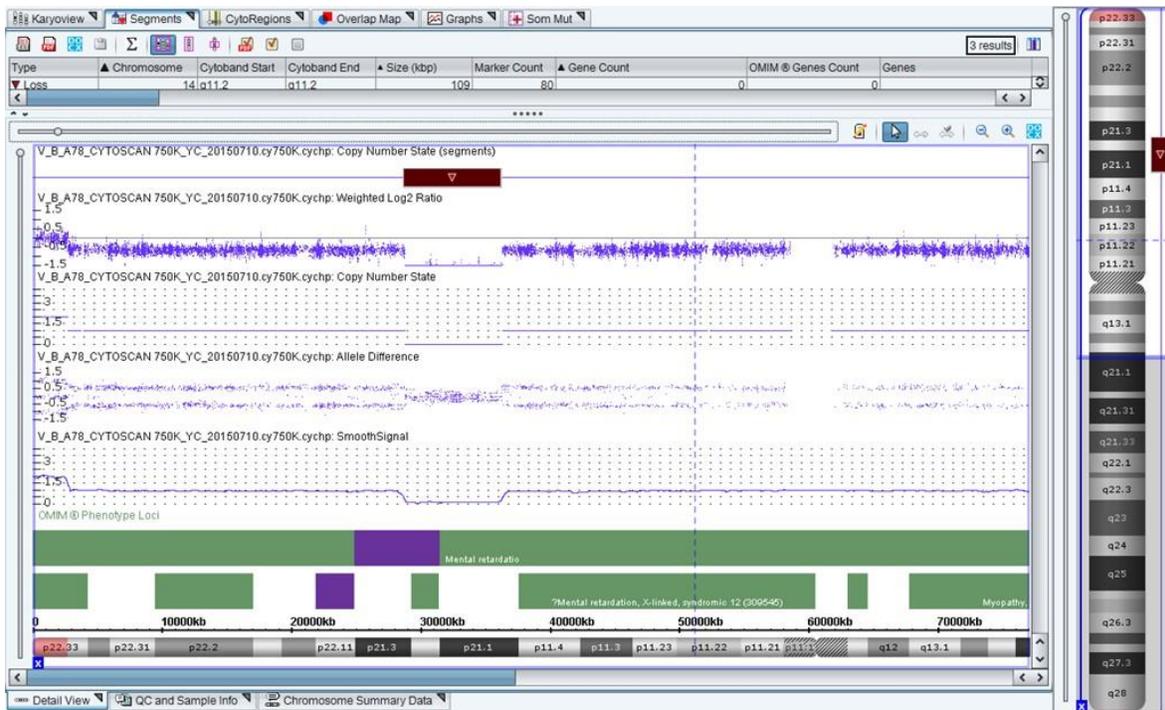


Imagen 2.36. Análisis por CGH del cromosoma X, a través de Cytoscan, donde se evidencia una deleción de 7.5 kb, que se extiende desde la región p21.1 hasta la región p21.3, y compromete aproximadamente 18 genes. Cortesía del doctor Juan Javier López, Colsanitas, Bogotá, Colombia

2.15. Conclusión

Las pruebas citogenéticas han realizado un aporte significativo para la identificación de la causa de un gran número de patologías genéticas, esto ha sido posible gracias a su versatilidad, que permitió pasar del análisis a través del microscopio por medio de tinciones a la utilización de marcadores fluorescentes y posteriormente al análisis computarizado con marcadores moleculares, con lo que se logró una mejoría progresiva en la resolución de las pruebas, lo que le da aun vigencia a la utilización de estas pruebas en el ámbito clínico.

3. PRUEBAS GENÉTICAS Y GENÓMICAS

A mediados de la década de 1980s, el genetista Thomas Roderick acuñó el término *GENOMICS*: en nuestra lengua, genómica o genes en los cromosomas, como un título para una revista que se encargaría de publicar temas relacionados con la secuenciación del genoma humano, el cartografiado de genes, el descubrimiento de genes nuevos, así como la innovación y las nuevas tecnologías en genética (Kuska, 1998).

La genómica intenta dilucidar el contenido, la organización, la función y la evolución de la información molecular contenida en el genoma (Kucherlapati, 2013); de esta forma, la genómica se puede dividir en dos ramas: la primera se denomina genómica estructural que está orientada a la caracterización y localización de las secuencias que están presentes en el ADN (Chance et al., 2002), mientras que la segunda es denominada genómica funcional, orientada a establecer el papel fisiológico desempeñado por los genes (Brent, 1999; Civelli, 1998).

Para cumplir con el propósito de estudio, fue necesario integrar diferentes estrategias de análisis en el laboratorio que, en conjunto, pueden ser llamadas tecnologías genómicas, las cuales son definidas como las acciones utilizadas para “manipular” y analizar la información genética contenida en el ADN. Los primeros métodos utilizados con este propósito fueron la reacción en cadena de polimerasa PCR (Valones et al., 2009), la secuenciación de Sanger (Sanger & Nicklen, 1977), la clonación de ADN y la creación de los organismos transgénicos (Galas & McCormack, 2003)

A partir del año 1995 se logró la secuenciación completa del genoma de un organismo, comenzando por *Haemophilus influenzae*, genoma que cuenta con una extensión de 1.8 Mb (Fleischmann et al., 1995); seguida de la secuencia del genoma de microorganismos procariontes y arqueobacterias, posteriormente, organismos eucariotes unicelulares como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

(Goffeau et al., 1997) o pluricelulares como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Consortium, 1998), el pez cebra *Danio rerio* (Howe et al., 2013), la planta *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) y finalmente, del hombre (*Homo sapiens*), como se evidencia con la publicación del borrador de la secuencia del genoma humano en 2001 (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001).

Luego de optimizar el rendimiento de los métodos de secuencia en el laboratorio, se trasladó la aplicación de las tecnologías genómicas como herramienta diagnóstica en patologías genéticas, particularmente el método de análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Boehm, 1989) y la secuenciación de Sanger (Ellard, Charlton, Yau, Gokhale, & Taylor, 2009). Estos dos métodos y la incorporación de otros nuevos ha ampliado el abanico de posibilidades diagnósticas a nivel genómico.

Actualmente se cuenta con pruebas de laboratorio que incorporan lo que se ha llamado tecnología de secuenciación de siguiente generación (*next generation sequencing*), como la secuenciación de genoma completo (*whole genome sequencing*), la secuenciación de la fracción del genoma codificante de proteínas o exoma (*whole exome sequencing*), los paneles multigenes (*multigene panel*), entre otros, los cuales se analizarán en el presente capítulo.

3.1 Secuenciación del ADN

El proceso de secuenciación consiste en determinar el orden de cada una de las bases que conforman el ADN de un individuo; desde 1977 este proceso se realizaba de acuerdo con el método propuesto por Sanger (Sanger & Nicklen, 1977), el cual permitía secuenciar únicamente fragmentos de ADN que no superaran 500 pb, haciendo éste un proceso demorado y costoso. La automatización de la secuenciación, y la introducción de métodos complementarios como la PCR que tiene una

sensibilidad entre 94.9-100% y una especificidad entre 72.4-93.8% para la identificación de defectos monogénicos (Dreesen et al., 2014); con ello se lograba secuenciar hasta 1000 pb/día, ante la necesidad de secuenciar más material genético y de tamaños mayores se optó por buscar opciones.

3.1.1 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación utiliza un método de síntesis para obtener la secuenciación del ADN, involucrando la PCR en emulsión (Fakruddin & Chowdhury, 2012). La técnica se basa en la detección de luminiscencia a partir del pirofosfato originado cuando el dNTP se une a la cadena de ADN en formación y la actividad de tres enzimas adicionales que son ATP-sulforilasa, luciferasa y apirasa, así como la participación de dos sustratos que son adenosin-fosfosulfato y la luciferina.

El proceso inicia de la misma forma que la secuenciación Sanger, con elementos adicionales ya descritos y los siguientes pasos:

1. Se adicionan de manera individual cada uno de los nucleótidos y, de acuerdo con la plantilla, estos nucleótidos van polimerizando una cadena; cuando el nucleótido adicionado no se une a la cadena de ADN es removido por la apirasa, cinco segundos luego de haber sido adicionado y se continua con la adición del siguiente nucleótido.
2. La unión del nucleótido es seguida de la liberación de un pirofosfato, el cual 1.5 segundos después, es transformado en ATP por medio de la ATP-sulforilasa.
3. Posteriormente, en menos de 0.2 segundos este ATP, es tomado por la luciferina y a través de la luciferasa, la luciferina se convierte en oxi-luciferina, que emite luz, la cual es captada por sensores que interpretan la polimerización del nucleótido adicionado.
4. La intensidad lumínica es representada por picos lumínicos, entre más alto sea el pico lumínico, más nucleótidos fueron adicionados a la cadena en formación.

La pirosecuenciación se ha utilizado con éxito en la identificación de mutaciones puntuales, tanto en ADN nuclear, como en ADN mitocondrial, alcanzando una sensibilidad entre el 96% - 100% y una especificidad del 90% (Huse, Huber, Morrison, Sogin, & Welch, 2007; Yan et al., 2014).

Diferentes condiciones pueden afectar el rendimiento de la pirosecuenciación, haciendo que su precisión se disminuya, entre estas condiciones encuentran: 1. La presencia de sales en la PCR inhibe a las enzimas participantes. 2. El método de remoción de los nucleótidos no utilizados, a través del lavado o por la acumulación de sustancias inhibitorias. 3. Ineficiencia en la eliminación de nucleótidos sobrantes por la apirasa, 4. El efecto dilución ocasionado por la adición constante de nucleótidos en cada ciclo, lo que aumenta el volumen total de la reacción y 5. La presencia de homopolimeros.

La pirosecuenciación ha venido perdiendo vigencia debido a la limitada longitud de las lecturas (aproximadamente 200 nucleótidos), pero continúa siendo aplicada en procesos de genotipificación y re-secuenciación de genes específicos entre otros.

En las décadas de los años 1980s y 1990s, además de la PCR, se lograron avances en biología molecular como los métodos de marcaje de ADN, así como la introducción de equipos automáticos que optimizaron la secuenciación de Sanger, aumentó la capacidad de procesamiento de secuencias y el resultado fue denominado “secuenciación de siguiente generación” o “secuenciación masiva en paralelo”, las cuales son tecnologías de secuenciación de alto rendimiento.

3.1.2 Secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequence*—NGS—)

La secuenciación de siguiente generación utiliza equipos automáticos de secuenciación, marcación con fluorescencia, separación por electroforesis capilar y detección automatizada de señales por medio de láser; de forma general la secuenciación de nueva generación consta de cuatro etapas:

1. Recolección de la muestra, en esta primera etapa se aísla el ADN que se desea analizar
2. Generación de la plantilla, el ADN obtenido en la primera etapa es fragmentado. A estos fragmentos se les liga un adaptador, que es una secuencia de ADN sintético que funciona como primer reverso para la amplificación o secuenciación de este fragmento.
3. Reacción de secuenciación, paso que puede iniciarse de dos formas, la primera realizando la secuenciación directamente de los templados generados, la segunda es someter la plantilla a una reacción de amplificación a través de PCR en emulsión, o por formación de puentes, para luego ser secuenciada.
4. Análisis de datos, en esta etapa los resultados de la secuenciación son sometidos a análisis bioinformáticos.

Dos aspectos son relevantes en el análisis de los resultados de la secuenciación, el primero de ellos es la COBERTURA, también denominada como PROFUNDIDAD DE COBERTURA (*depth coverage*), la cual se define como el número promedio de veces que cada nucleótido es secuenciado en un número determinado de lecturas aleatorias a lo largo del genoma (Lander et al., 2001); la cobertura es dada con el sufijo X por ejemplo 20X, indica que en promedio cada nucleótido fue secuenciado 20 veces. En la tabla 3.1 se detallan los niveles de cobertura en una secuenciación.

El segundo aspecto a tener en cuenta es la AMPLITUD o AMPLITUD DE COBERTURA (*breadth coverage*), el cual se refiere al porcentaje de bases objetivo que son secuenciadas en un número determinado de veces, por lo que la amplitud de una secuencia puede ser del 95%.

Fold Coverage	Po	% no seq nt	% seq nt
1X	$e^{-1} = 0.37$	37	63
2x	$e^{-2} = 0.135$	13.5	87.5
3x	$e^{-3} = 0.05$	5	95
4X	$e^{-4} = 0.018$	1.8	98.2
5X	$e^{-5} = 0.0067$	0.6	99.4
6X	$e^{-6} = 0.0025$	0.025	99.75
7X	$e^{-7} = 0.0009$	0.09	99.91
8X	$e^{-8} = 0.0003$	0.03	99.97
9X	$e^{-9} = 0.0001$	0.01	99.99
10X	$e^{-10} = 0.000045$	0.005	99.995

Tabla 3.1. porcentaje de cobertura en una secuenciación de acuerdo al valor de X, modificada de la presentación de secuenciación de Rodrigo Santamaría de la Universidad de Salamanca España y (Pevsner, 2009). *Po*: probabilidad que el nucleótido este presente, *% no seq nt*: porcentaje de no secuenciación del nucleótido, *% seq nt*: porcentaje de secuenciación del nucleótido.

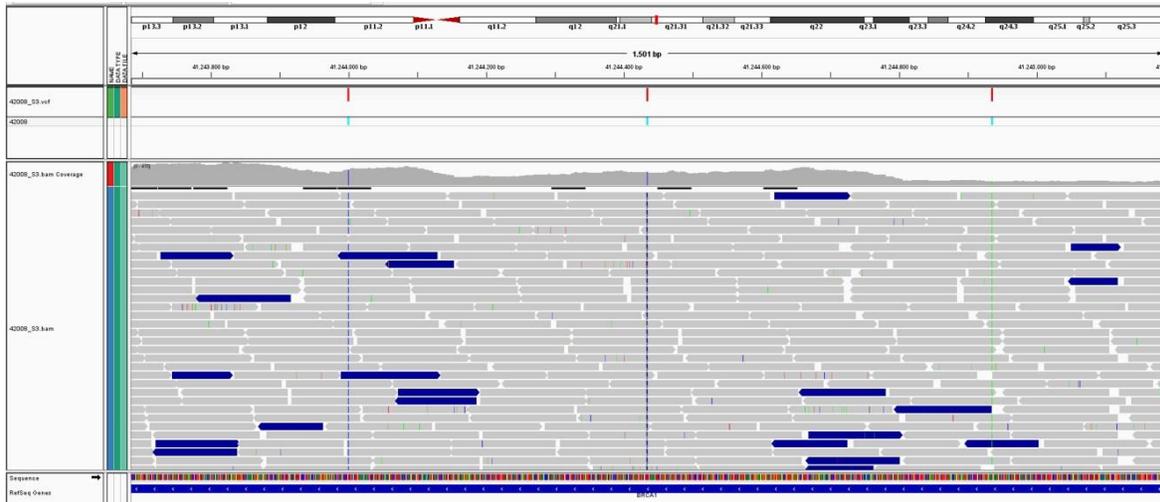


Imagen 3.1. Nivel de profundidad visualizado a través del sistema IGV –*Integrative Genomic Viewer*–, el cual permite el análisis de los resultados obtenidos a partir de los métodos de secuenciación de siguiente generación. Cortesía de la doctora Claudia Serrano, Genetix, Bogotá, Colombia.

A través de la secuenciación de siguiente generación, se puede lograr un rendimiento que oscila entre las 440 Mb a 600 Gb de material genético secuenciado por corrida (Rizzo & Buck, 2012), permitiendo una considerable disminución en los costos y en el tiempo de análisis. Para tener una idea del beneficio de estas nuevas tecnologías, la secuenciación del genoma humano costó aproximadamente 3.000 millones de dólares y fue realizada en 13 años (Lander et al., 2001), en la actualidad la secuenciación de un genoma tarda un par de semanas y su precio oscila entre los 3.000 a 5.000 dólares, y se espera que continúe disminuyendo hasta alcanzar los mil dólares norteamericanos (DePristo, 2010; Hayden, 2014).

El mejoramiento en el rendimiento y la disminución de los costos de la secuenciación, permitió la aplicación de este método en campos como la medicina. Un ejemplo de la utilidad de la secuenciación de siguiente generación fue la detección de la fusión de los genes *PML-RARA*, la cual

estaba implicada en el desarrollo de la leucemia promielocítica aguda (Welch et al., 2011). Estudios posteriores principalmente en el campo de la oncología, mostraron la aplicación clínica, y la superioridad del costo-beneficio (Cottrell et al., 2014; Roychowdhury et al., 2011), debido a la presencia de un mayor rendimiento diagnóstico por la capacidad de análisis de todos genes presentes en el genoma (Chan, 2009).

3.1.2.1 Secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing –WGS-*)

A partir de 2003, con la secuenciación del genoma humano, los avances en los métodos de secuenciación y los resultados obtenidos en los estudios de validación clínica en oncología, se comenzó a proponer la secuenciación de genoma completo como herramienta para la identificación de la causa molecular en enfermedades mendelianas; es así como se implementaron las primeras pruebas en padecimientos como el síndrome Charcot-Marie-Tooth (Lupski et al., 2010) y la ataxia espinocerebelosa (T. Jiang, Tan, Tan, & Yu, 2014), entre otros.

La secuenciación de genoma completo identifica mutaciones *de novo* (Jiménez-escrig, Gobernado, & Sánchez-herranz, 2012), detecta SNV o *single-Nucleotide Variant*, y logra una alta calidad de genotipado (*genotype call*), entendiéndose este último como la correcta determinación del genotipo, superando a la secuenciación de exoma en este aspecto (Belkadi, Bolze, Itan, & Vincent, 2014). Por esta razón la secuenciación de genoma completo fue tomado como examen de rutina por el Colegio Médico de Wisconsin y el Hospital de Niños de Wisconsin a partir del 2010 (Bick & Dimmock, 2011).

A nivel clínico la secuenciación de genoma completo se ha aplicado de forma exitosa en diferentes áreas que van desde la identificación de mutaciones en pacientes con inmunodeficiencia primaria (Mousallem et al., 2015), pasando por la identificación de cepas de microorganismos con genotipo

de resistencia a antibióticos (Witney et al., 2015) y diagnóstico prenatal (Talkowski et al., 2012), hasta llegar a la identificación de mutaciones somáticas por pérdida de heterocigocidad que deriven en una patología oncológica (J. M. Foster et al., 2015) y la identificación de desórdenes mendelianos (Willig et al., 2015).

En la actualidad se cuenta con varias plataformas para secuenciación de genoma completo, en la tabla 3.2 se describen algunas de sus características.

Plataforma	Método de secuenciación	Profundidad de cobertura	Tasa de falsos positivos
Roche	Pirosecuenciación	7.4X – 22X	$3 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-5}$
Illumina	Terminación reversa	27X – 41X	$3 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-5}$
ABI SOLiD	Secuenciación por ligamiento	18X	3×10^{-5}
Helicose	Terminación reversa	28X	3×10^{-5}
Ion Torrent	Secuenciación por iones	10.6X	3×10^{-5}

Tabla 3.2. Plataformas de secuenciación. Adaptado de (Beal, Glenn, & Somers, 2012).

A pesar de la amplia aceptación de la secuenciación de genoma completo como método diagnóstico, Dewey y colaboradores encontraron que hasta el 20% de los genes relacionados con enfermedad hereditaria evaluados no tenían una cobertura aceptable para identificar SNV y una baja reproducibilidad para la identificación de pequeñas inserciones/deleciones (Dewey et al., 2016), esto sumado al gran volumen de información sobre variantes genómicas desconocidas o de importancia desconocida que representaba en algunos casos confusión para la interpretación del resultado de la secuenciación (Ormond et al., 2010), estos hallazgos impulsaron la utilización de la

secuenciación de exoma completo, como método más preciso por ahora, en el diagnóstico de patologías hereditarias.

3.1.2.2 Secuenciación de exoma completo (*Whole Exome Sequencing*–WES-)

Este método permite la secuenciación de las regiones codificantes del genoma, es decir los exones, que representan entre el 1 al 2% del total del genoma humano. También puede ser extendido a las regiones que codifican elementos funcionales no proteicos (Warr et al., 2015); de esta forma, se logra disminuir el costo de la secuenciación hasta en un 30%.

La diferencia con WGS es la captura de los exones, este proceso se denomina enriquecimiento, existiendo captura basado en solución (García-García et al., 2016), basado en arreglos (Albert et al., 2007), por sondas de inversión molecular *Molecular Inversion Probes MIP* (Hardenbol et al., 2005; Turner, Lee, Ng, Nickerson, & Shendure, 2009) y PCR (Harismendy & Frazer, 2009), los cuales se describen en la tabla 3.3. Los pasos siguientes en el proceso son similares a los previstos para la secuenciación de genoma completo.

Método de captura	Material genético requerido	Sensibilidad	Especificidad	Reproducibilidad
Solución	3 µg por cada 30 Mb de objetivo	> 95% CRO ¹	> 80% CRO ¹	> 97%
Array (arreglo)	10-15 µg por cada 30 Mb de objetivo	98.6% CRO ¹	>70% CRO ¹	>95%
MIP	200 ng	> 98%	> 98%	Sin información
PCR	8 µg	> 99.5%	> 93%	> 80%

Tabla 3.3 Métodos de captura de exones; ¹CRO: captura de regiones objetivo. Adaptado de (Mamanova et al., 2010).

La utilización de la captura selectiva de blancos genómicos permitió realizar la secuenciación a objetivos seleccionados con el propósito de identificar variantes genéticas que se relacionen con mutaciones patológicas (Warr et al., 2015); esta ventaja otorgada por WES, fue demostrada con la identificación la mutación causal del síndrome Miller (S. B. Ng et al., 2010).

De esta forma se comenzó a implementar la secuenciación de exoma completo como método para la identificación de condiciones genéticas desconocidas (Need et al., 2012); la identificación de desórdenes hereditarios (Yohe et al., 2015), la identificación de defectos genéticos en pacientes con padres consanguíneos (Makrythanasis et al., 2014; Sawyer et al., 2014), de defectos en el neurodesarrollo (Srivastava et al., 2014), de patologías neurodegenerativas hereditarias (Patiño et al., 2014) y de defectos mitocondriales hereditarios (Wortmann, Koolen, Smeitink, van Den Heuvel, & Rodenburg, 2015), teniendo una tasa de diagnóstico cercana al 52%, la cual es superior a la lograda con la secuenciación Sanger que alcanza solo el 25% (Neveling et al., 2013)

Teniendo en cuenta las aplicaciones diagnósticas y de cribado que pueden ser ejecutadas a través de la secuenciación de siguiente generación, fue necesario establecer parámetros que orientaran las indicaciones y la forma de interpretación de estos dos enfoques, con este propósito *The American College of Medical Genetics and Genomics –ACMG-*, estableció una serie de puntos que deben ser considerados en el momento de aplicar una prueba de secuenciación, que se describen a continuación.

3.1.2.3 Indicaciones de secuenciación de siguiente generación para la realización de una prueba diagnóstica o de cribado

Una prueba de WES/WGS debe ser considerada en la valoración clínica diagnóstica de una persona con un fenotipo afectado cuando:

- El fenotipo o la historia familiar indiquen fuertemente que se encuentra implicada una alteración genética, pero el fenotipo no corresponde con un desorden específico para el cual se encuentre disponible una prueba genética.
- El paciente presenta un desorden genético que demuestra un alto grado de heterogeneidad genética y la realización de WES/WGS, brinda un enfoque más práctico.
- La prueba genética disponible para identificar una condición específica falla en lograr el diagnóstico de un paciente con un fenotipo que debe ser identificado por esta prueba.
- En un feto con una condición de probable origen genético a quien de forma prenatal se le aplicó una prueba de secuenciación, la cual falla para identificar el diagnóstico.

Las pruebas de WES/WGS pueden ser consideradas para la realización de cribado pre-concepcional de portadores, esta estrategia debe estar basada en variantes genéticas conocidas de estar asociadas con fenotipos patológicos.

Así mismo da relevancia a la asesoría genética que debe recibir previa a la realización de la prueba, tendientes a orientar sobre los posibles resultados que puede ser generados y que resultados puede o no pueden ser divulgados por la prueba.

El reporte de WGS/WES puede generar hasta 90 mil variantes únicas que deber ser filtradas por medios bioinformáticos (Gilissen, Hoischen, Brunner, & Veltman, 2012), que clasifican las variantes en dos grupos o bien sean benignas o patogénicas, estos es posible cuando estas variantes cumplen una serie de criterios propuestos por el Colegio Americano de Genética Medica, para ser ubicadas en alguno de estos dos grupos, de esta forma, las variantes se clasifican en 1. Patogénicas, 2. Probablemente patogénicas, 3. Benignas, 4. Probablemente benignas. Cuando no es posible establecer claramente el carácter benigno o patogénico de la variante, ésta debe ser catalogada como *Variant of Uncertain Significance (VUS)* o Variante de Significado Incierto (Nykamp et al., 2017; Richards et al., 2015).

De la misma forma WGS/WES puede identificar variantes patogénicas que no están relacionadas directamente con el fenotipo actual del paciente, como por ejemplo variantes relacionadas con enfermedades de inicio tardío, predisposición al cáncer, o enfermedades con expresividad variable, constituyendo esto un hallazgo incidental o secundario (Lapin et al., 2016); estos hallazgos pueden tener una utilidad clínica, sin embargo se debe tener en cuenta que la prueba inicial no fue dirigida a la identificación de dicha variante por lo que se sugiere confirmar los hallazgos a través de métodos directos sobre el gen alterado (Green, Berg, Grody, Kalia, Korf, Martin, McGuire, Nussbaum, O'Daniel, Ormond, Rehm, Watson, Williams, & Biesecker, 2013).

la NGS, permitió el desarrollo de diferentes pruebas para condiciones particulares que requerían el análisis simultáneo de genes, a partir de ello surge el panel multigenes, con este nuevo enfoque fue posible la evaluación de entidades con heterogeneidad genética como por ejemplo el síndrome de cáncer hereditario y respuestas anormales a medicamentos por mencionar algunas de ellas.

3.2 Paneles multigenes

Los paneles multigenes permiten simultáneamente analizar varios genes (una o más decenas o centenas) y están disponibles desde el 2012 (Dalton & Thompson, 2015); se estructuraron a partir de la secuenciación masiva en paralelo. El análisis simultáneo de varios genes disminuye el costo y el tiempo utilizado para el estudio de una patología con heterogeneidad genética como, por ejemplo, el síndrome Lynch (genes *MSH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y *EPCAM*), sorderas de origen congénito, condiciones asociadas a déficit de atención o las displasias esqueléticas, por mencionar algunas (Domchek, Bradbury, Garber, Offit, & Robson, 2013)

Inicialmente el diseño de los paneles multigenes se hacía de acuerdo con las necesidades establecidas por cada patología o para cada paciente; el primer paso en la construcción de los

paneles es la selección de los genes para analizar, lo cual se realiza a partir de los genes reportados en la literatura (Kurian et al., 2014). Posteriormente, se ofrecieron paneles prediseñados cuya capacidad de análisis incluía desde los genes con mayor penetrancia para una determinada patología hasta aquellos paneles que incluían otros genes de menor penetrancia.

Los tipos de paneles multigénicos son: 1. Panel comprensivo o *comprehensive panel*, en los que se incluyen genes reportados en la literatura y que tiene una relación con la patología que se estudia, sin importar el nivel de penetrancia que tengan en el desarrollo de la enfermedad; 2. Panel basado en guías clínicas *guidelines-based panel*, estos se desarrollan a partir de recomendaciones realizadas por las guías de la práctica clínica o por un grupo de expertos en la materia; 3. Panel sitio específicos *site-specific panel*, este panel está diseñado para analizar únicamente los genes con alta penetrancia para una condición patológica específica y 4. Panel personalizado o *customizable panel*, el cual contiene los genes que son de interés para el especialista que solicita el estudio (Lynce & Isaacs, 2016).

Actualmente hay un aumento considerable y notorio del uso de paneles multigénicos en la práctica clínica, principalmente en oncología, donde debido a la heterogeneidad que se presenta en muchos de los síndromes de cáncer hereditario, se hace dispendioso y costoso el análisis de forma individual de cada uno de los genes implicados en una condición, es por ello que los paneles de multigenes se presentan como una opción costo-efectiva con una sensibilidad y especificidad cercana al 100% (Cottrell et al., 2014)

Además, los paneles multigenes brindan la posibilidad de identificar variantes que pueden tener significado patológico y que no son detectadas por los métodos tradicionales de análisis genético (H.-J. Kim et al., 2016; Lincoln et al., 2015)

A continuación se relacionan algunos ejemplos de paneles multigenes disponibles comercialmente, los cuales están enfocados para una determinada patología.

Institución	Panel	Condición analizada	Genes analizados	
www.cincinnatchildren.org/service/h/heart-institute/diagnostic-lab/genetic-testing/	Panel de arritmias	Fibrilación auricular	16	
		Bloqueo aurículo ventricular	6	
		Síndrome Brugada	15 genes	
		Canalopatías cardíacas	32 genes	
		Cardiomiopatía arritmogénica ventricular derecha	13 genes	
		Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica	6 genes	
		Sind. QT largo	14 genes	
		Sind. QT corto	6 genes	
		Panel de cardiomiopatías	Cardiomiopatía hipertrófica	23 genes
		Cardiomiopatía dilatada	30 genes	
		No compactación ventricular izquierda	13 genes	
		Cardiomiopatía restrictiva	9 genes	
		Panel de heterotaxias	Heterotaxia V1	13 genes
Heterotaxia V2	17 genes			
www.genetests.org/tests/	Panel de defectos cardíacos congénitos	Estenosis supra valvular aórtica, defectos septales atriales, tetralogía de	6 genes	

				Fallot, síndrome Alagille , síndrome Holt-Oram y síndrome CHARGE	
http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/	Panel completo de cardiomiopatía	multigen de	Cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía arritmogénica ventricular derecha, no compactación ventricular izquierda, síndrome Cantú, síndrome Noonan, síndrome Costello, miopatía miofibrilar, síndrome Brugada, síndrome Barth		55 genes
http://ctgt.net/panel/congenital-heart-disease-ngs-panel	Panel NGS para enfermedad cardíaca congénita		Síndrome estenosis aortica, defecto septal atrial, defecto septal aurículo-ventricular, tetralogía de Fallot, <i>ductus</i> arterioso persistente, trasposición de grandes vasos, síndrome Alagille, síndrome de corazón derecho hipoplásico, síndrome Adams-Oliver, síndrome Holt-Oram, heterotaxia ligada a X	CHARGE,	15 genes

Tabla 3.4. Paneles multigenes para el análisis de defectos cardíacos congénitos

Institución	Panel	Condición analizada	Genes analizados
http://www.estudiosgeneticos.com.ar/estudiosgeneticos/panelesgeneticospaaraepilepsiayenfermedadesneurologicas	Panel integral para epilepsia	Convulsiones generalizadas, convulsiones focales, síndrome West, síndrome Lennox-Gastaut	53 genes
	Panel infantil para epilepsia	Convulsiones generalizadas, convulsiones focales, síndrome West, síndrome Ohtahara	38 genes
	Panel adolescente para epilepsia	Síndrome electro-clínico, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia mioclónica progresiva, epilepsia idiopática generalizada, epilepsia de Lafora	21 genes
	Panel de epilepsia progresiva mioclónica	Enfermedad de Lafora, Enfermedad de Unvericht-Lundborg, Enfermedad de Batten	12 genes
http://www.ggc.org/diagnostic/tests-costs/test-finder/ngs-epilepsy-seizure-panel	Panel de Convulsiones/Epilepsia	Formas síndromicas y no síndromicas de epilepsia	145
http://www.courtagen.com/test	EPISEEK®	Desordenes síndromicos y no síndromicos asociados con epilepsia	76
http://geneticslab.emory.edu/tests/MEPI1	Panel para desordenes convulsivos y epilepsia	Formas síndromicas y no síndromicas de epilepsia	123
https://www.genedx.com/test-catalog/genetic-testing-for-neurological-disorders/	Panel de Epilepsia STAT	Convulsión neonatal familiar benigna, convulsión infantil-neonatal benigna, encefalopatía epiléptica de inicio temprano, síndrome West, síndrome Ohtahara, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus, síndrome RETT, síndrome RETT atípico,	22 genes

	deficiencia cerebral de folato, síndrome de deficiencia de creatinina	
Panel de epilepsia mioclónica progresiva	Enfermedad de Lafora, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Unverricht-Lundborg, deficiencia cerebral de folato.	17 genes
Panel de Epilepsia infantil	Síndrome de deficiencia de creatinina, síndrome RETT, síndrome RETT atípico, síndrome Pitt-Hopkins, síndrome Angelman y similar a Angelman, síndrome Mowat-Wilson, epilepsia mioclónica progresiva, Lipofuscinosis ceroide neuronal, deficiencia de Adenosuccinato liasa, deficiencia cerebral de folato, síndrome EAST, epilepsia generalizada idiopática, desordenes del comportamiento, lenguaje, aprendizaje con epilepsia	75 genes
Panel integral para epilepsia	Convulsión neonatal familiar benigna, convulsión infantil-neonatal benigna, epilepsia mioclónica infantil familiar, encefalopatía epiléptica de inicio temprano, síndrome West, síndrome Ohtahara, epilepsia focal autosómica dominante, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus, epilepsia mioclónica progresiva, síndrome RETT y RETT atípico, Pitt-Hopkins, síndrome Angelman y similar a Angelman, síndrome Mowat-Wilson, epilepsia mioclónica progresiva, Lipofuscinosis ceroide neuronal, deficiencia de Adenosuccinato liasa, deficiencia	87 genes

cerebral de folato, epilepsia y migraña epiléptica, deficiencia de adenosuccinato liasa, síndrome EAST, epilepsia generalizada idiopática, desordenes del comportamiento, lenguaje, aprendizaje con epilepsia.

Tabla 3.5 Paneles multigenes para epilepsia.

Institución	Método	Condición analizada	Genes analizados
http://dnatesting.uchicago.edu/tests/ataxia-exome-panel	Panel de 57 genes para ataxias hereditarias	Síndrome Acalasia-adisonismo-alácrima, anemia sideroblástica y ataxia espino-cerebelar, ataxia de inicio temprano con apraxia oculomotora e hipoalbuminemia, ataxia sensitiva tipo 1 AD, ataxia-apraxia oculomotora tipo 3, ataxia-telangiectasia <i>like</i> , síndrome Cayman, ataxia cerebelar sordera y narcolepsia AD, síndrome ataxia cerebelar retardo mental y desequilibrio tipo 1, síndrome ataxia cerebelar retardo mental y desequilibrio tipo 2, síndrome ataxia cerebelar retardo mental y desequilibrio tipo 4, xantomatosis cerebrotendinosa, CMTD axonal tipo 2N, deficiencia primaria de Coenzima Q10, desorden congénito de glicosilación tipo 1q, distonía 9.	57 genes

https://www.genetests.org/ests/	Panel para ataxia Espino-cerebelar	Ataxia espino-cerebelar 1,2,3,6 y 7	5 genes
http://www.athendiagnostics.com/view-full-catalog/a/ataxia,-common-repeat-expansion-evaluation	Evaluación de expansión de repeticiones comunes en ataxia	SCA 1, SCA 2, SCA 3, SCA 6, SCA 7, SCA 8, SCA 10, SCA 17.	7genes
	Evaluación completa de ataxias autosómicas dominantes	SCA 1, SCA 2, SCA 3, SCA 5, SCA 6, SCA 7, SCA 10, SCA 11, SCA 12, SCA 13, SCA 14, SCA 15, SCA 17, SCA 19, SCA 23, SCA 26, SCA 27, SCA 28, SCA 35, DRPLA, EA1, EA2, EA5,	25 genes
	Evaluación suplementaria de ataxias recesivas	Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva tipo 10, ataxia con apraxia oculomotora tipo 1, ataxia telangiectasia, síndrome Marinesco-Sjogren, ataxia con déficit de vitamina E, Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva tipo 9, ataxia de la columna posterior con retinitis pigmentosa, Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva tipo 13, síndrome de ataxia recesiva mitocondrial, Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva asociada a SYNE1, Ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva con neuropatía axonal, SPAX4, SPAX5, desorden similar a ataxia telangiectasia	17 genes
	Evaluación de ataxia de Friedreich	Ataxia de Friedreich	FXN

Tabla 3.6 Paneles multigenes para ataxias hereditarias. SCA ataxia espinocerebelosa, EA ataxia esporádica.

La precisión de los paneles multigenes puede variar de un panel a otro, por lo que es posible encontrar pruebas que reportan una sensibilidad y una especificidad superior al 90% (Nikiforov et al., 2015); sin embargo, en fechas recientes esta precisión ha aumentado y es cercana al 100% (Lind et al., 2011); otros autores incluso informan una sensibilidad y especificidad del 100%, como ocurre principalmente para los paneles para neoplasias (Lanman et al., 2015)

3.3 Pruebas de farmacogenética

El término farmacogenética fue acuñado por Vogel en 1959 para referirse al efecto de la variación genética sobre la respuesta a un medicamento, la isoniacida (Motulsky & Qi, 2007). La farmacogenómica se define como la aplicación de la genómica (el conjunto de genes dispersos por todos los cromosomas), para el estudio de la variabilidad humana en respuesta a medicamentos (Lindpaintner, 2002), en el presente capítulo se hará referencia principalmente a la farmacogenética.

La farmacogenética estudia las diferencias en la respuesta fisiológica a diferentes medicamentos, las cuales son derivadas de las variaciones presentes en un gen determinado de la persona que va a ser tratada. Evalúa si presenta una respuesta normal, es decir, se alcanza el efecto esperado; parcial, cuando el efecto es incompleto o se requiere de modificaciones en la dosificación para alcanzar el efecto esperado, fallida o si presentan eventos adversos serios. El marcador biológico más usado en la farmacogenética son los polimorfismos del ADN (Linder & Valdes, 2001); de esta forma la farmacogenética permite estratificar a las personas como respondedores o no respondedores frente a un tratamiento determinado, establece la posibilidad de que se presenten respuestas indeseables y optimiza el manejo médico (Fischel-Ghodsian, 2005).

A continuación se describen las características de las personas de acuerdo con la tasa de metabolismo, con esto se establece un fenotipo, a partir del cual se puede indicar la realización de una prueba de farmacogenética.

Fenotipo	Características
Ultra metabolizador	Requiere incremento en las dosis del medicamento; debido a una tasa de metabolismo más alta de lo normal
Metabolizador común	La dosificación requerida del medicamento es la esperada; su capacidad de metabolismo se encuentra dentro de la norma
Metabolizador intermedio	Puede requerir dosis más bajas que el promedio para lograr una respuesta terapéutica óptima.
Metabolizador pobre	Depuración disminuida del medicamento, que aumenta el riesgo de efectos adversos o falta de efecto terapéutico secundario a imposibilidad de lograr la forma activa del medicamento.

Tabla 3.7 Características fenotípicas de acuerdo con la tasa de metabolización de una persona.

Adaptado de (Valdes & Yin, 2016).

La variabilidad interindividual en respuesta a los medicamentos fue demostrada en la década de 1970s, cuando se evaluaron los niveles plasmáticos de medicamentos en gemelos monocigóticos y dicigóticos; los estudios dieron como resultado que los niveles séricos de los medicamentos permanecían similares en los gemelos monocigóticos, a diferencia de una gran variabilidad en los niveles de los mismos en los gemelos dicigóticos (Walley, Nicoletti, & Goldstein, 2010); esto último se refleja principalmente en la respuesta adversa a los tratamientos.

El primer ejemplo sobre polimorfismos genéticos identificados, se relacionó con la respuesta variable a medicamentos relacionada con el gen *CYP2D6*, el cual participa activamente en el metabolismo de por lo menos el 20% de todos los medicamentos administrados al ser humano y

que, de acuerdo a la variación de secuencia, puede dar como resultado una actividad metabólica normal, rápida, lenta o abolida (Ingelman-Sundberg, 2005).

Estudios posteriores aportaron datos que señalaban a los polimorfismos en el ADN como determinantes de la respuesta variable a los medicamentos (F. D. Martinez, Graves, Baldini, Solomon, & Erickson, 1997) y como la identificación de estos polimorfismos en pacientes candidatos a esos tratamientos, podía disminuir la presencia de reacciones adversas; de esta manera, reorientando el tratamiento con base en la tasa de metabolización que tenga el paciente, de acuerdo al polimorfismo presente (Rauch et al., 2006; Saladores et al., 2015).

A partir de la identificación de una gran cantidad de polimorfismos que modifican la respuesta a determinados medicamentos, se propuso la realización de un “diagnóstico de compañía” *companion diagnostic*, con el cual se pretende identificar marcadores asociados con una respuesta específica a un medicamento en particular (Valdes & Yin, 2016).

La FDA *Food and Drug Administration*, ha sugerido la realización de pruebas farmacogenéticas cuando se inician algunos tratamientos particulares, siendo especialmente aplicadas en oncología, psiquiatría o dermatología, así como en el manejo de infecciones. La FDA propone una lista de biomarcadores para farmacogenética que se encuentran registrados en una tabla que puede ser consultada en

<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>

Se estima que entre el 5–20% de los ingresos hospitalarios son secundarios a problemas relacionados con medicamentos, dados por reacciones adversas, polifarmacia, fallo terapéutico y efectos secundarios (Nivya, Sri Sai Kiran, Ragoo, Jayaprakash, & Sonal Sekhar, 2015).

En la actualidad se encuentran disponibles diferentes pruebas de farmacogenética, principalmente basadas en NGS, a continuación se mencionan algunas de las pruebas que se encuentran comercialmente:

Laboratorio	Prueba	Indicación	Genes evaluados
http://genelex.com/pharmacogenetic-tests/	You Script Polypharmacy	Polifarmacia	<i>CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 y CYP3A5</i>
	You Script Polypharmacy Basic	Polifarmacia	<i>CYP2D6, CYP2C19 y CYP2C9</i>
	You Script Cardio	Cardiología	<i>CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, VKORC1, F2/Factor II, F5/Factor V Leiden, MTHFR y SLCO1B1</i>
	Thrombosis	Coagulación	<i>F2/Factor II, F5/Factor V Leiden y MTHFR</i>
	Warfarin (coumadin)	Coagulación	<i>CYP2C9 y VKORC1</i>
	You Script Psychotropic	Psiquiatría	<i>CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2, HTR2A y SLC6A4/5-HTT</i>
	You Script Psychotropic	Psiquiatría	<i>CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, ADRA2A, CYP1A2, CYP2B6, COMT, GRIK4, HTR2A, HTR2C, MTHFR y SLC6A4/5-HTT</i>
	You Script ADHD	Psiquiatría	<i>CYP2D6, COMT, ADRA2A</i>
	You Script Analgesic	Dolor	<i>CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, COMT y OPRM1</i>
http://www.pgxlab.com/test-menu/	PGXL Multi-Drug sensitivity Panel	Polifarmacia	<i>CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, VKORC1, SLC6A4, OPRM1, SLCO1B1, MTHFR, COMT,</i>

*Factor II, Factor V, NAT2, HLA-B*5701*

http://mayoresearch.mayo.edu/center-for-individualized-medicine/drug-gene-testing.asp	CYP2C19/citalopram		Efectos secundarios de antidepresivo citaloram	<i>CYP2C19</i>
	CYP2C19/Clopidogrel Pharmacogenomic Test	Lab	Predictor de respuesta al Clopidogrel	<i>CYP2C19</i>
	CYP2C19/escitalopram Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar efectos secundarios de antidepresivo escitalopram	<i>CYP2C19</i>
	CYP2C9 VKORC1/Warfarin Pharmacogenomic Test	Lab	y Predecir respuesta a anticoagulación con warfarina	<i>CYP2C9 – VKORC1</i>
	CYP2D6/Codeine Pharmacogenomic Test	Lab	Predecir respuesta al analgésico Codeína	<i>CYP2D6</i>
	CYP2D6/Fluoxetine Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar riesgo de presentar efectos secundarios al antidepresivo fluoxetina	<i>CYP2D6</i>
	CYP2D6/Fluvoxamine Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar el riesgo potencial de efectos secundarios con el antidepresivo Fluvoxamine	<i>CYP2D6</i>
	CYP2D6/Paroxetine Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar el riesgo potencial de efectos secundarios con el	<i>CYP2D6</i>

			antidepresivo Paroxetine	
CYP2D6/Tramadol Pharmacogenomic Test	Lab	Predecir respuesta al analgésico Codeína	<i>CYP2D6</i>	
CYP2D6/Venlafaxine Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar el riesgo potencial de efectos secundarios con el antidepresivo Venlafaxine	<i>CYP2D6</i>	
HLA-B*1502/Carbamazepine Pharmacogenomic Test	Lab	Identificar riesgo de efectos secundarios graves de la Carbamazepina	<i>HLA-B*1502</i>	
HLA-B*5701/Abacavir Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar el riesgo potencial de efectos secundarios con el antiviral Abacavir	<i>HLA-B*5701</i>	
HLA-B*5801/Allopurinol Pharmacogenomic Test	Lab	Determinar el riesgo potencial de efectos secundarios con el alopurinol	<i>HLA-B*5801</i>	
SLCO1B1/Simvastatin Pharmacogenomic Test	Lab	Identificar el riesgo de efectos secundarios con la Simvastatina	<i>SLCO1B1</i>	
TPMT/Thiopurines Pharmacogenomic Test	Lab	Prueba de cribado para una variante del gen tiopurin metil transferasa, previo al inicio de terapia con azatioprina, mercaptopurina y tioguanina	<i>TPMT</i>	

http://www.admerahealth.com/pgx/	PGxOne™Plus Pharmacogenomics test	Predice la respuesta de los paciente a un grupo de casi 150 medicamentos, distribuidos en 6 especialidades de intervención que son cardiología (29), psiquiatría (31), manejo de dolor (22), oncología (20), medicina interna (41) y urología (5); esta evaluación se basados en el perfil genético individual	<i>ATM, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP4F2, DDRGK1, DPYD, F II, F V, G6PD, HLA-B, IFNL3, ITPA, LDLR, MTHFR, NAT2, STK11, TPMT, UGT1A1 y VKORC1</i>
https://www.labcorp.com/wps/portal	HLA-B*5710 Genotyping	Determinar riesgo incrementado de hipersensibilidad	<i>HLA-B*5710</i>
	Tamoxifen P450 2d6 Genotyping	Detección de variantes que modifique el metabolismo del tamoxifeno	<i>CYP2D6</i>
	Warfarin (Cytochrome P450 2C9 and VKORC1)	Identificación de pacientes con hipersensibilidad y riesgo aumentado de presentar efectos secundarios	<i>CYP2C9, VKORC1</i>
	UGT1A1 for Irinotecan Toxicity	Identificación de polimorfismos que indiquen necesidad de ajuste de dosis	<i>UTG1A1</i>

		para el medicamento Irinotecan	
DPD for 5-Fluorouracil Toxicity		Identificar riesgo de toxicidad por el 5- fluorouracilo	DPYD

Tabla 3.8. Pruebas genéticas en farmacogenética

Adicionalmente, existen diferentes bases de datos que recopilan información referente a la identificación de nuevos polimorfismos que se hallan asociados a una respuesta variable a medicamentos; desde el año 2.000 se encuentra en funcionamiento *The Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmaGKB)*, que se encarga de recopilar información que tenga relación con la variación genética humana y la respuesta a medicamentos (<http://www.pharmagkb.org/>).

Así mismo existen otras plataformas que aportan información sobre polimorfismos de importancia en farmacogenética, como: GenBank, *Gene Expression Omnibus* y ddGAP en los Estados Unidos de América (Sim, Altman, & Ingelman-Sundberg, 2011). A continuación en la tabla 3.9 se listan algunas plataformas involucradas en la gestión de información referente a polimorfismos, vías metabólicas de medicamentos, respuesta a medicamentos, entre otros.

Sitio en la red	Vínculo	Información aportada
PharmaGKB	http://www.pharmgkb.org/	Variantes, asociación entre variantes y medicamentos, vías metabólicas de medicamentos, resumen de genotipos
CPIC	http://www.pharmgkb.org/page/cpic/	Guías de la práctica clínica, guías de dosificación de medicamentos.
DrugBank	http://www.drugbank.ca/	Base de datos de medicamentos, farmacogenómica/medicamentos,

			interacción medicamentos/alimentos, enzimas metabólicas.
SCAN		http://www.scandb.org/	SNPs, herramientas para el análisis de GWAS
PACdb		http://www.pacdb.org/	Farmacología, expresión génica, genotipos,
Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature database		http://www.cypalleles.ki.se/	Alelos e isoformas del gen <i>CYP450</i> , relación entre genotipo y fenotipo
Cytochrome P450 Drug Interaction Table		http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/clinical-table/	Interacción entre las isoformas CYP450 y los medicamentos
FDA's pharmacogenetic website		fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.html	Respuesta clínica y variabilidad en la exposición a medicamentos, recomendación sobre la dosis de acuerdo con el genotipo, mecanismos del medicamento, biomarcadores de variantes en genes somáticos y de línea germinal.

Tabla 3.9. Recursos en la red de internet. Adaptado de (G. Zhang, Zhang, Ling, & Jia, 2015)

3.4 Biomarcadores

Un biomarcador es una característica (molecular, histológica, fisiológica etc.), que es objetivamente medida y evaluada como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Naylor, 2003); por lo tanto los biomarcadores pueden tener diferentes orígenes. Seguidamente se presentarán biomarcadores basados en ácidos nucleicos.

Los biomarcadores pueden ser usados de manera directa o indirecta en la valoración clínica, el diagnóstico o para clasificar la severidad de una enfermedad (Atkinson A.J. et al., 2001). De acuerdo a su propósito, existen diferentes tipos de biomarcadores los cuales se resumen a continuación:

Biomarcador	Descripción
Riesgo/susceptibilidad	Indica la predisposición o el riesgo de desarrollar una enfermedad en una persona
Diagnostico	Identifica personas con la enfermedad o condición de interés
Monitorización	Detecta cambios a través del tiempo en el grado o la extensión de la enfermedad
Pronostico	Identifica la probabilidad de un evento clínico, recurrencia de la enfermedad o progresión de la misma
Predictivo	Identifica las personas que son propensos a presentar una respuesta favorable o desfavorable a una intervención específica (tratamiento)
Farmacodinamia	Muestra la respuesta biológica que ha presentado una persona que recibe una intervención o exposición
Seguridad	Monitoriza la toxicidad

Tabla 3.10 Tipos de biomarcadores

Por otro lado se ha propuesto la clasificación de los biomarcadores en grupos a saber: 1. Biomarcadores del tipo 0 que permiten el seguimiento de la historia natural de la enfermedad a través del tiempo. 2. Biomarcadores del tipo I que sirven para hacer el seguimiento del efecto de una determinada intervención y 3. Biomarcadores del tipo II que son marcadores sustitutos o marcadores de valoración indirecta (Naylor, 2003).

El uso de biomarcadores se remonta al siglo XIV, durante el cual se utilizaba la uroscopia – observación directa de las características de la orina-, para determinar el color, la presencia de sedimentos y, a partir de estos, proponer un diagnóstico (Connor, 2012). A mediados del siglo XX se

usó la citogenética para identificar alteraciones cromosómicas como por ejemplo el cromosoma filadelfia, el cual era utilizado como biomarcador para seleccionar que pacientes se pueden beneficiar de determinados tratamientos (Sahu et al., 2011); más recientemente, la utilización del gen y el receptor *HER-2* como biomarcadores, han permitido establecer el pronóstico de la enfermedad e identificar las pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento en particular (Pupa, Tagliabue, Ménard, & Anichini, 2005).

En la actualidad los biomarcadores se aplican principalmente en dos áreas, la primera es la farmacéutica, donde participan como indicadores en los procesos de farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos en estudio; la segunda es el área clínica, donde principalmente intervienen en la identificación de mecanismos fisiopatológicos, seguimiento y predicción.

3.4.1 Biomarcadores de ADN

La utilización del ADN como biomarcador se basa en la estabilidad que tiene esta molécula a lo largo de la vida de una persona, así mismo aprovecha la variabilidad interindividual que se evidencia con la presencia de SNPs, STRs, inserciones o deleciones (Ziegler, Koch, & Krockenberger, 2012), las cuales son variantes susceptibles de medición y que permiten no solo diferenciar un individuo de otro, sino también permiten identificar diferencias en un mismo individuo, detectando variantes patológicas, este último aspecto se ha aplicado principalmente en el área oncológica (Sidransky, 2002), donde variantes en diferentes genes (ver tabla 3.11), son tomados como marcadores que permiten establecer pronóstico o seleccionar una terapia específica (Debnath, Prasad, & Bisen, 2005).

Prueba	biomarcador	Indicación	Aplicación
Mammaprint®	ADN	Pronostico	Cáncer de mama
K-RAS	ADN	Pronostico/Predictivo	Cáncer colorrectal
MCAM	ADN	Pronostico	Melanoma
NPM1	ADN	Pronostico	Leucemia mieloide aguda
Oncotype DX®	ADN	Predictivo/pronostico	Cáncer de mama, cáncer de colon
BluePrint®	ADN	Predictivo	Cáncer de mama
EGFR	ADN	Predictivo	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
IL28B	ADN	Predictivo	Virus de la hepatitis C
SLCO1B1	ADN	Predictivo	Infarto miocárdico
BRAF	ADN	Predictivo	Gliomas pediátricos/astrocitoma

Tabla 3.11. Aplicaciones de los biomarcadores de ADN. Adaptado de (Weinstein, Leininger, Hamby, & Safai, 2014; Ziegler et al., 2012).

3.4.2 Biomarcadores de ARN

El ácido ribonucleico (ARN) es una molécula que continuamente se transcribe y en algunos casos se traduce, como respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos, por lo que una correcta interpretación del perfil de ARN puede servir como reflejo del estado funcional actual de una célula o sistema (P. Rao, Benito, & Fischer, 2013). El ARN puede ser obtenido a partir de dos fuentes, la primera, una fuente extracelular como la saliva (Lin, Lo, Wong, & Xiao, 2015), plasma (Hunter et al., 2008) y orina (Alvarez, Khosroheidari, Kanchi Ravi, & DiStefano, 2012), entre otros; y una fuente intracelular como las células polimorfonucleares en la sangre periférica (Voellenkle et al., 2010) y células tumorales (Corcoran, Rani, & O'Driscoll, 2014) por mencionar algunos.

Los biomarcadores de ARN principalmente utilizados proceden de moléculas no codificantes (ncRNA), los cuales se dividen en ARN cortos, medianos y largos (Yu et al., 2015), con longitudes que

van desde los 25 nucleótidos y pueden alcanzar hasta los 200 nucleótidos (Yarmishyn & Kurochkin, 2015).

El primer ARN reportado fue el lin-4, en el *C. elegans* (R. C. Lee, 1993), el análisis de su perfil de expresión, permitió establecer que este marcador se encuentra conservado en eucariotas, concluyendo que su presencia es crucial a nivel funcional; posteriormente se analizó el perfil de expresión del ARN en pacientes con leucemia linfocítica crónica, estableciendo una asociación entre la expresión del miRNA-13 y la progresión y el pronóstico de la enfermedad (Calin et al., 2005).

A partir de estos hallazgos y aprovechando las nuevas tecnologías en biología molecular, se comenzó a validar la utilización de biomarcadores de ARN en diferentes patologías. A continuación se relacionan algunas de ellas:

Patología	Biomarcador ARN	observación	Referencia
Carcinoma de células renales	MALAT1	Diagnóstico, sensibilidad 89%, especificidad 91% y pronóstico HR 2.97	(Chen et al., 2016)
Cáncer gástrico	MiRNA-21	Predictivo, su sobre-expresión disminuye la sensibilidad a trastuzumab, mientras que una supresión produce resistencia al trastuzumab	(Eto et al., 2014)
Cáncer próstata	PSGR – PCA3	Diagnóstico, sensibilidad >95%, especificidad 34% para la detección de cáncer de próstata	(B. Lee et al., 2014; Rigau et al., 2010)
Cáncer colorrectal	HOTAIR	Pronóstico, la expresión aumentada eleva el riesgo de muerte, sensibilidad de 92.5% y especificidad 67%	(T. Shi, Gao, & Cao, 2016)
Endometriosis	NR_038395 NR_038452 ESNT00000482343 ENST00000544649	Diagnostico-Pronostico, el análisis de los biomarcadores tiene una sensibilidad de 89.66% y especificidad 73.17% para identificación de mujeres con	(W. Wang et al., 2016)

	ENST00000393610	endometriosis; una sensibilidad de 75% y especificidad de 63% para la identificación de adhesión pélvica por endometriosis y una sensibilidad de 82% con especificidad de 57% para la identificación de compromiso del ovario por endometriosis	
Cáncer pulmonar de células no pequeñas	Panel de 64 long ncRNA	Diagnóstico, sensibilidad de 100% y especificidad de 95.6% para la discriminación entre tejido tumoral y tejido normal	(Yu et al., 2015)

Tabla 3.12. Uso de biomarcadores ARN

3.4.3 Biomarcadores epigenéticos

La epigenética se encarga del estudio de las modificaciones estables y heredables que intervienen en la capacidad de expresión de los genes, y que no están establecidos en la secuencia de ADN (Eccleston, DeWitt, Gunter, Marte, & Nath, 2007), el termino epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en 1942, cuando se refería a la ejecución del fenotipo a partir de las instrucciones potenciales de un genotipo (Waddington, 2012)

La regulación epigenética está comprendida por 5 mecanismos: 1. Metilación del ADN, 2, modificaciones pos-traduccionales de las histonas, 3. Variantes de histonas, 4. ARN interferente y 5. Organización nuclear (García-Giménez et al., 2012), los cuales constituyen la llave que permite la actividad de los genes, induciendo su función o silenciando la misma y pueden; la regulación epigenética puede presentar alteraciones como consecuencia de influencias ambientales (Barreda, 2010).

El primer registro que mostró la relación entre una alteración epigenética y el desarrollo de una enfermedad se presentó en 1983, cuando se relacionó el papel de la hipometilación de regiones repetitivas con células cancerígenas (Feinberg & Tycko, 2004); a partir de esto, se fue acumulando información sobre el efecto de las alteraciones epigenéticas y su incidencia en la generación de enfermedades; de esta forma se estableció que se presentaban enfermedades epigenéticas puras, las cuales se deben a una alteración en la introducción de las marcas epigenéticas y otras enfermedades epigenéticas mixtas, las cuales además de este componente se asociaba a una alteración genética (Franco Vera, 2009).

De forma progresiva se vio la posibilidad de utilizar marcas epigenéticas como biomarcadores para la identificación de enfermedades, inicialmente evaluando la metilación del ADN (Y. J. Zhang et al., 2007) y posteriormente con la identificación de micro ARN con longitudes entre 19 – 25 nucleótidos (Vega-robledo & Oliva-rico, 2014). A continuación se relacionan algunos biomarcadores epigenéticos.

Patología	Biomarcador	Observación	Referencia
Cáncer gástrico	miR-342, miR-16, miR-181, miR-1	Predictivo, resistencia a quimioterapia con cisplatino/fluorouracilo	(C. H. Kim et al., 2011)
Cáncer gástrico	Let-7i	Pronóstico, la expresión baja, está relacionada con progresión del tumor, resistencia a quimioterapia y baja sobre vida	(K. Liu et al., 2012)
Glioblastoma	miR-21, miR-128 y miR-342-3p	Diagnóstico, niveles elevados de miR-21 y disminuidos de miR-128 y miR-342-3p de glioblastoma multiforme	(Q. Wang et al., 2012)
Desordenes bipolares.	Hsa-miR134	Monitorización. Niveles disminuidos en episodios maniacos, que retornar a	(Rong et al., 2011)

Episodios maniacos		normalidad luego de 4 semanas de tratamiento.	
Hepatitis B	miR-101	Pronóstico, niveles disminuidos en infección por hepatitis B. Niveles elevados se relacionan con carcinoma hepatocelular secundario a infección por hepatitis B	(Fu et al., 2013)
Tuberculosis	miR-361-5p, miR-889 y miR-567-3p	Diagnóstico, el análisis combinado de estos tres marcadores tiene una sensibilidad y una especificidad superior al 86% para el diagnóstico de tuberculosis	(Qi et al., 2012)
Cáncer colorrectal	Metilación de la vimentina	Sensibilidad 88%, especificidad 87% para la detección de carcinoma	
Cáncer gástrico	Metilación del promotor del gen <i>HOP</i> <i>homeobox</i>	Sensibilidad de 84% y especificidad 87% para discriminar tejido tumoral vs normal en cáncer gástrico	(Ooki et al., 2010)

Tabla 3.13. Algunos biomarcadores epigenéticos.

3.5 Conclusión

Uno de los avances que aceleró el desarrollo de la biología molecular fue el proyecto Genoma Humano, el cual incluyó la creación de nuevos métodos de secuenciación y la optimización de los ya existentes. Los nuevos métodos de secuenciación han venido siendo implementados con otros propósitos, particularmente el diagnóstico genético y las nuevas terapéuticas basadas en biología molecular.

En lo referente al diagnóstico genético actualmente se ha simplificado el estudio de cientos de patologías de origen genético, particularmente aquellas que presentan heterogeneidad genética (varios genes causando el mismo fenotipo), dado que se puede realizar el análisis simultáneo de varios de los genes implicados con un padecimiento específico. Otra de las aplicaciones, hablando de farmacogenómica, es la posibilidad de analizar un grupo amplio de farmacogenes e identificar y

predecir las respuestas individuales o colectivas del genotipo cuando una persona sea expuesta a un medicamento o el análisis de un grupo de genes implicados en diversos tipos de cáncer hereditario. En los tres casos, los estudios de paneles de genes consiguen ahorros importantes en dinero y tiempo.

Si bien el uso de las nuevas metodologías ha acelerado el diagnóstico genético, existen otros avances en el estudio de las modificaciones epigenéticas, la identificación de biomarcadores y la identificación de los elementos regulatorios de la función de los genes para el diagnóstico de padecimientos genéticos, el cáncer, las enfermedades infecciosas, mentales, degenerativas y complejas.

4. PRUEBAS DE IDENTIFICACION HUMANA

4.1 Sistema de grupos sanguíneos y factor RH

Los métodos genéticos de identificación humana se iniciaron en las primeras décadas del siglo XX luego de ser descritos grupos sanguíneos como el sistema ABO por Karl Landsteiner en 1901, el cual se basaba en la identificación de glicoproteínas denominadas antígenos A, B y O, localizadas en la superficie de los eritrocitos (Hosoi, 2008); este sistema abrió la posibilidad de establecer una relación entre el grupo sanguíneo de cada persona y enfermedades o estados de salud como en el caso del cáncer (Wolpin et al., 2009; Xie, Qureshi, Li, & Han, 2010), de enfermedades infecciosas (Deepa, Alwar, Rameshkumar, & Ross, 2011), así como estados patológicos como trombosis (Jukic et al., 2009), coronariopatías (Karabuva, Carević, Radić, & Fabijanić, 2013) e incompatibilidad de grupo en recién nacidos (Akgül, Korkmaz, Yiğit, & Yurdakök, 2013), por mencionar algunas.

A mediados de la década del 40 del siglo pasado Landsteiner y Wiener (Durie, 1952), identificaron el factor Rh a partir del suero obtenido después de administrar glóbulos rojos del mono Rhesus a conejos; luego, el suero era puesto en contacto con glóbulos rojos humanos, que presentaban un proceso de aglutinación en el 85% de las muestras expuestas, fenómeno que fue denominado como Rh positivo. Por otra parte el 15% de las muestras de glóbulos rojos que no presentaban aglutinación fueron denominados Rh negativo (N D Avent & Reid, 2000); de esta forma se pudo realizar la adecuada identificación de la sangre antes de una transfusión, disminuyendo considerablemente las reacciones transfusionales; de la misma forma, se encontró que tanto el sistema ABO como el Rh, permitían identificar e individualizar a una persona.

En la actualidad se dispone de más de 30 sistemas distintos de grupos sanguíneos, clasificados a partir de variaciones en aminoácidos, por la presencia de glucoproteínas o glucolípidos (Yamamoto,

2004), de los cuales el más utilizado es el sistema ABO. Otros sistemas que se pueden mencionar son: Kell, Duffy (Meny, 2010), MNS (Reid, 2009), Kidd, Lutherano y Lewis, entre otros (N D Avent & Reid, 2000; Reid, 2009); sin embargo, actualmente no se utilizan para determinar la filiación biológica debido a su bajo poder de exclusión (PE). El poder de exclusión de un sistema genético es la probabilidad de excluir al mayor número de padres que no son el padre biológico de un hijo. Cuando se utiliza el sistema ABO como prueba de filiación, el PE de este sistema es cercano al 18% (R Chakraborty, Shaw, & Schull, 1974; Mertens G., Vandenberghe A., 1999), el factor Rh proporciona un PE entre el 10 y el 25% (Mertens G., Vandenberghe A., 1999; Restrepo, 2006), mientras que el de todos los grupos sanguíneos puede alcanzar un PE acumulado (PEA) del 68% (R Chakraborty et al., 1974; Salvat Puiig, 2001; Yamamoto, 2004). Sin embargo a pesar de la utilización de diversos sistemas para hacer aún más confiable el PE, estas no lograban alcanzar un valor óptimo para la exclusión, esto es, un valor de PE>99.9%.

4.2 Proteínas séricas

Con el propósito de aumentar el poder de exclusión, se utilizaron otros marcadores de forma conjunta con los sistemas sanguíneos; entre ellos encontramos las proteínas séricas, las cuales pueden ser analizadas a partir de sus variantes alélicas que son heredadas de forma mendeliana codominante, con las cuales se puede hacer la comparación entre los alelos parentales y los de la descendencia (Alper & Propp, 1968; Leikola, Fudenberg, Kasukawa, & Milgrom, 1972; Peña, Alfonso-sánchez, García-obregón, & Pérez-Miranda, 2002). Un número aproximado de 30 proteínas séricas se han usado con este propósito y tienen un poder de exclusión acumulado entre el 82 % al 96% (R Chakraborty et al., 1974), en la tabla 4.1 se listan algunas de ellas.

Proteína	Alelos	Poder de exclusión
Acetilcolinesterasa	AchE ¹ , AchE ²	11%
Alcohol deshidrogenasa (locus 2)	ADH ₂ ¹ , ADH ₂ ²	4%
Alcohol deshidrogenasa (locus3)	ADH ₃ ¹ , ADH ₃ ²	18%
Alfa 1 antitripsina	Pi ^M , Pi ^F , Pi ^S , Pi ^Z	15% - 18%
Complemento tercer componente (C3)	S, F, F ₈	8% - 15%
Glutación reductasa	GR ¹ , GR ² , GR ³ , GR ⁴ , GR ⁵ , GR ⁶	2%
Haptoglobina alfa	Hp α ¹ , Hp α ²	15% - 18%
Peptidasa A	Pep A ¹ , Pep A ² , Pep A ³ , Pep A ⁸	7% - 16%
6 fosfogluconato deshidrogenasa	PGD ^a , PGD ^c	2% - 5%

Tabla 4.1 proteínas utilizadas en identificación humana. Modificada de (R Chakraborty et al., 1974)

4.3 Polimorfismos cromosómicos

De forma paralela a los grupos sanguíneos y las proteínas séricas, los polimorfismos cromosómicos se venían utilizando como forma de identificación. Este sistema se basaba en las características morfológicas variables propias de cada cromosoma, es decir, se analizan las regiones variables llamadas heteromorfismos, que se encuentran presentes en los cromosomas 1, 9, 12 y 16 y otros presentes en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (satélites). Para la evaluación correcta de las regiones polimórficas de los cromosomas, éstos se tiñen por diferentes métodos de bandeado cromosómico (Metaxotou, Kalpini-Mavrou, Panagou, & Tsenghi, 1978), como por ejemplo el bandeamiento NOR, que evidencian las regiones organizadoras nucleares localizadas en los satélites de los cromosomas acrocéntricos o el bandeamiento C para evidenciar regiones heteromórficas centroméricas, entre otras. Luego de realizar este proceso, se comparan los cromosomas del hijo con los cromosomas parentales, buscando estos polimorfismos que, se heredan de forma Mendeliana (Van Dyke, Palmer, Nance, & Yu, 1977). Al igual que los marcadores

anteriores, el poder de exclusión de los polimorfismos cromosómicos es bajo, no alcanza el 30% (Armendares, Buentello, Salamanca, & Lisker, 1990), por lo cual su uso en la identificación humana fue disminuyendo progresivamente hasta ser reemplazados por otros *loci* de mayor poder de exclusión.

4.4 Antígeno leucocitario humano *Human Leucocyte Antigen* (HLA)

El análisis del sistema de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) permitió reconocer la compatibilidad para el trasplante entre personas y esta propiedad se aplicó a la filiación. El HLA fue usado para evaluar la respuesta al trasplante de un tejido tumoral alogénico a cepas de ratones susceptibles, encontrándose que la posibilidad o no, de crecimiento tumoral estaba genéticamente determinada (Thorsby, 2009). Luego, hacia finales de los años 50s, Jean Dausset publicó los resultados del estudio de sueros de pacientes poli-trasfundidos, encontrando que el suero aglutinaba los leucocitos de determinados sujetos, sin aglutinar el suero del donante, con lo que concluyó que detectaba aloantígenos de los leucocitos. Este sistema fue llamado inicialmente MAC en honor a tres participantes del experimento de Dausset y al ampliarse el estudio, se encontró que el 60% de la población francesa poseía este antígeno, de esta forma se reconoció la importancia que podía tener para los trasplantes.

Estudios similares al realizado por Dausset, fueron llevados a cabo por Van Rood, Payne y los esposos Bodmer; en esta oportunidad fue utilizado el suero de mujeres multíparas, a través del cual se pudo establecer la presencia de al menos 3 tipos distintos de antígenos leucocitarios. A partir de estos resultados creció el interés en la identificación y el análisis de estos antígenos. Solo hacia 1967 fueron realizados diferentes estudios de antígeno leucocitario en familias (Thomson, 1991). A partir de los resultados de estos, se pudo establecer una región cromosómica 6p21, que contenía un

cúmulo de genes que se relacionan estrechamente con la respuesta inmune y fue denominado *human leucocyte locus A HL-A*.

Durante el desarrollo del tercer Taller Internacional de Histocompatibilidad (*International Histocompatibility Workshop*) en 1968, se estableció el sistema de nomenclatura asignando el nombre actualmente en uso, sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) (Thorsby, 2009). El sistema HLA está organizado en tres clases de moléculas a saber: la clase I, que hace referencia a las moléculas que se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas y la clase II, se refiere a las moléculas que se expresan en los linfocitos B, las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T activados. Además de estas dos clases de moléculas, en el cromosoma 6 existe una tercera región, HLA de clase III, que contiene genes que, aunque no codifican moléculas HLA, codifican componentes complementarios como C2, C4, o el factor de necrosis tumoral, entre otros (Choo, 2007).

El sistema HLA es el más polimórfico de los sistemas genéticos humanos, esto debido a variaciones en los aminoácidos que permiten formas alternativas y originan la especificidad de las moléculas de HLA. Los antígenos HLA varían entre los diferentes grupos étnicos, así como de forma individual y se heredan de forma mendeliana en bloques haplotípicos, lo que permite utilizarlos como marcadores para selección de donantes en trasplantes (Tait et al., 2013) y para la realización de pruebas de paternidad, para las cuales alcanza un poder de exclusión de aproximadamente el 93% (Chakravarti & Li, 1983; Walker, Meyers, & Phillips, 1987). El análisis se realiza por medio del método de Terasaki o prueba de microlinfocitotoxicidad, la cual consiste en poner en contacto linfocitos con antisueros A, B y C, en pozos individuales, los cuales se ponen en incubación y posteriormente se les adiciona complemento C; si el linfocito posee el antígeno que es reconocido por el antisuero, el complemento lisa la célula, para hacer esto visible, se añade un colorante como azul tripan u otro colorante supra vital para que ingrese en la célula lisada (Gebel, Liwski, & Bray, 2013),

posteriormente se introdujeron los métodos basados en secuenciación específica de oligonucleótidos –*sequence-specific oligonucleotide*- o secuenciación específica con un cebador –*sequence specific primer*- combinado con PCR (Erlich, 2012). La combinación de las dos técnicas permitían establecer si dos motivos de secuencias polimórficas son iguales o diferentes, dando esto un nivel de resolución bajo o intermedio, el cual es equivalente al logrado en pruebas serológicas y a través del cual es posible identificar únicamente el gen al que pertenece y el grupo alélico, proporcionando una nomenclatura de dos dígitos (Nunes et al., 2011).

En la actualidad, los métodos de análisis para la tipificación de los genes *HLA*, están basados en secuenciación de Sanger; sin embargo, se ha encontrado que métodos como la NGS permite un mejor abordaje en el análisis de estos genes, esto se debe al alto rendimiento y la mayor resolución que ofrece, sumado a la posibilidad de identificar otras alteraciones como las variantes de nucleótido único (*single-nucleotide variant –SNV-*) o inserciones y deleciones (Indels), que puedan escapar a la secuenciación de Sanger (Hosomichi, Shiina, Tajima, & Inoue, 2015); por lo tanto la NGS ofrece un nivel de resolución alto, dando la posibilidad que combinado con otros métodos se identifique la proteína HLA específica y cambios sucedidos en el ADN, de esta forma se amplía la información brindada y es posible alcanzar una nomenclatura de 4 dígitos, donde se incluyen los nuevos hallazgos (Nunes et al., 2011); el sistema HLA se utiliza ampliamente para la selección de receptores para órganos donados.



Figura 4.1. Nomenclatura utilizada en la tipificación del HLA. Adaptada de (Nunes et al., 2011).

4.5 Fingerprinting

En la década de los años 80s emergió un método denominado *DNA fingerprinting*, cuyo principio está basado en el uso de enzimas de restricción que identifican polimorfismos en el ADN que son debidos a la presencia o ausencia de un sitio de corte específico para una enzima. La presencia o ausencia del sitio de corte ocasiona cambios en la longitud del fragmento, a lo que se le llama *RFLP* y se puede visualizar bajo el método de *Southern blot* (Gill, Jeffreys, & Werrett, 1985). Dada la variabilidad de los alelos para un locus genómico dado, se puede realizar la comparación del material genético nuclear de un sospechoso con el hallado en una escena de un crimen o con respecto al material genético de otro individuo (Jeffreys, 2005). La primera aplicación del *DNA fingerprinting* ocurrió en 1985, cuando se logró establecer la relación filial entre un niño inmigrante y su mamá, quien se encontraba refugiada en el Reino Unido, con un PE >99% (Gill et al., 1985); no obstante es un método laborioso, con baja reproducibilidad y altos requerimientos técnicos (Cawood, 1989).

4.6 Repeticiones cortas en tándem -*Short Tandem Repeats* (STRs)-

Conocido el hecho que la variabilidad individual se expresaba en el ADN, posteriormente cobró importancia el estudio con otros marcadores de ADN, del tipo STR (*short tandem repeats*), que se localizan en todos los cromosomas y consisten en repeticiones variables de secuencias de entre 2 a 7 bp que se repiten una tras de otra entre media docena y varias docenas de veces (John M. Butler, 2007), figura 4.2, los cuales son estables y se transmiten a través de las generaciones (A. Edwards, Hammond, Jin, Caskey, & Chakraborty, 1992), estos hallazgos impulsaron una agresiva investigación con el fin de determinar la variación poblacional y el número de STRs necesarios para que los resultados fueran fiables (Kimpton et al., 1993, 1996).

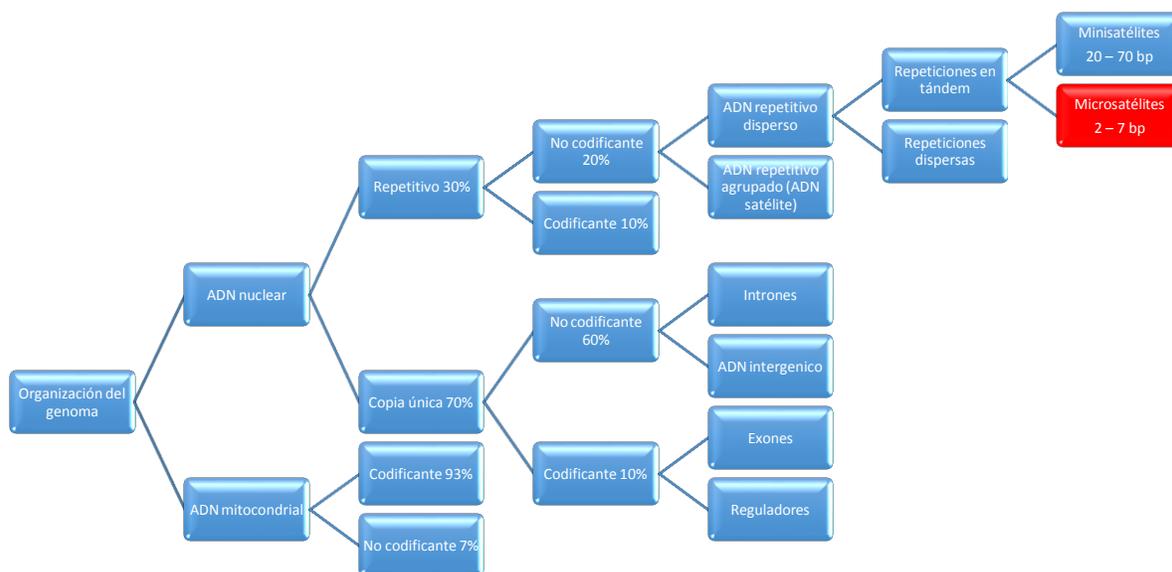


Figura 4.2. Organización del genoma Humano y localización de los STRs (rojo).

Después de hacer diversas aproximaciones sobre que marcadores STRs son útiles para la identificación humana (John M. Butler, 2006); la Oficina Federal de Investigación (FBI) de los Estados Unidos de América, seleccionó algunos marcadores con importancia en la investigación forense y propuso el llamado CODIS, *Combined DNA Index System*, como la piedra angular del reconocimiento e identificación humana a partir del ADN genómico en los procesos forenses, que estuvo basada en el análisis para cada persona de 13 STRs y un marcador de sexo (Katsanis & Wagner, 2013).

La identificación humana basada en el ADN genómico, utiliza los STRs previstos en el CODIS, que se hallan dispersos en casi todos los cromosomas (Agrawal & Khan, 2005); estos son heredados de forma mendeliana de padres a hijos con muy pocas variaciones (mutaciones “*de novo*”), Tabla 4.2. Los genotipos de cada individuo y los alelos segregados permiten realizar el análisis y seguimiento de un linaje particular (Willems, Gymrek, Highnam, Mittelman, & Erlich, 2014).

MARCADOR	CROMOSOMA	LOCALIZACION	TASA DE MUTACION
TPOX	2	2p25.3	$1.65 \times 10^{-3} / 1.05 \times 10^{-4}$
D3S1358	3	3p21.31	$1.68 \times 10^{-3} / 2.55 \times 10^{-4}$
FGA	4	4q28	$3.71 \times 10^{-3} / 4.94 \times 10^{-4}$
D5S818	5	5q23.2	$1.66 \times 10^{-3} / 2.69 \times 10^{-4}$
CSF1PO	5	5q33.1	$1.98 \times 10^{-3} / 3.19 \times 10^{-4}$
D7S820	7	7q21.11	$1.37 \times 10^{-3} / 7.23 \times 10^{-4}$
D8S1179	8	8q24.13	$2.06 \times 10^{-3} / 3.33 \times 10^{-4}$
THO1	11	11p15.5	$5.20 \times 10^{-3} / 6.03 \times 10^{-4}$
VWA	12	12p13.31	$3.25 \times 10^{-3} / 4.68 \times 10^{-4}$
D13S317	13	13q31.1	$1.74 \times 10^{-3} / 4.03 \times 10^{-4}$
D16S539	16	16q24.1	$1.03 \times 10^{-3} / 5.25 \times 10^{-4}$
D18S51	18	18q21.33	$2.23 \times 10^{-3} / 7.93 \times 10^{-4}$
D21S11	21	21q21.1	$1.75 \times 10^{-3} / 1.18 \times 10^{-3}$

Tabla 4.2 Marcadores previstos por el CODIS para identificación humana modificado de (Ge, Eisenberg, & Budowle, 2012).

En la actualidad se ha aumentado el número de STRs y se han propuesto STRs de uso específico en algunas poblaciones, como el llamado Estándar Europeo, además de los recomendados en el CODIS, alcanzándose un análisis de 20 STRs, esto con el fin de aumentar el poder de exclusión y discriminación de la prueba (que es muy elevado), y reducir el riesgo de falsos positivos. Una red global de laboratorios bajo el auspicio del FBI, han estado validando un nuevo conjunto de STRs (D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 y D22S1045), que serán incluidos en los nuevos estuches de identificación luego de terminar su fase de implementación en el año 2017 (Hares, 2015).

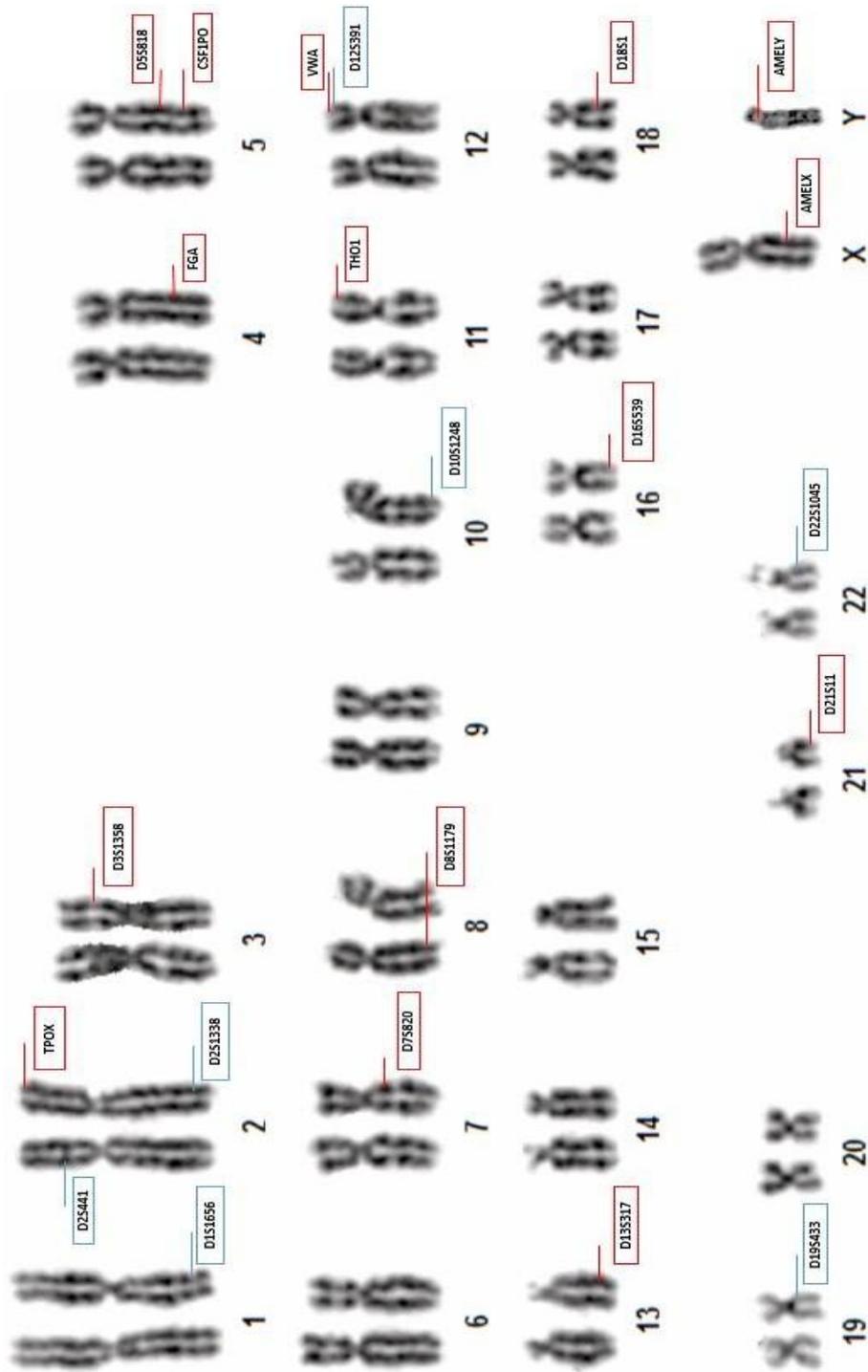


Imagen 4.1. Ubicación de los *loci* analizados en el CODIS (en rojo los previstos clásicamente; en azul los nuevos marcadores), más los marcadores AMELX y AMELY. Modificado de (Abrahams & Benjeddou, 2011), cortesía de los doctores López y Serrano.

Las pruebas de identificación utilizan estuches comerciales para su realización, en cada uno de ellos se puede encontrar diferentes marcadores STR; el número de ellos puede alcanzar hasta 24 STRs autosómicos. Los diferentes estuches comerciales tienen en común que todos ellos realizan el análisis de los marcadores dispuestos en el CODIS y adicionalmente a estos, cada estuche ofrece diferentes opciones que aumentan el número de STR.

MARCADOR	LOCALIZACION	PODER DE EXCLUSION EN HISPANOS
TPOX	2p25.3	0.392
D3S1358	3p21.31	0.495
FGA	4q28	0.739
D5S818	5q23.2	0.525
CSF1PO	5q33.1	0.450
D7S820	7q21.11	0.574
D8S1179	8q24.13	0.599
THO1	11p15.5	0.618
VWA	12p13.31	0.555
D13S317	13q31.1	0.638
D16S539	16q24.1	0.567
D18S51	18q21.33	0.767
D21S11	21q21.1	0.586
D1S1656	1q42	0.733
D2S1338	2q35	0.671
D2S441	2p14	0.505
D10S1248	10q26.3	0.464
D12S391	12p12	0.658
D19S433	19q12	0.643
D22S1045	22q12.3	0.397
SE33	6q14	0.878
D6S1043	6q16.1	0.7475
PENTA D	21q22.3	0.6782
PENTA E	15q26.2	0.8184

Tabla 4.3 Marcadores STR disponibles en los diferentes estuches comerciales de identificación humana. Modificado (Ranjit Chakraborty & Stivers, 1996; Hadi, Abdullah, Jaber, & Yoke, 2014)

4.7 Determinación del sexo

Un factor importante en la identificación humana es la determinación del sexo o género del individuo en estudio, la cual permite complementar la información obtenida mediante los STRs autosómicos (Diegoli, 2015), es por ello que un grupo de marcadores STR localizados en los cromosomas X y Y se incluyen en algunos estuches comerciales para mejorar la capacidad de identificación (Castañeda Fernandez, 2013).

4.7.1 Cromosoma X

El uso inicial de los STRs en los cromosomas sexuales incluyó la identificación indirecta de un marcador del tipo STR ligado a una mutación (identificación de portadoras) en enfermedades ligadas a X, como son los casos de Distrofia Muscular de Duchenne, Hemofilia y Deficiencia de G6PD (Szibor, 2007), entre otras enfermedades comunes; luego, ésta observación se ha usado para establecer también una relación de parentesco entre los padres y su progenie (N. Pinto, Gusmão, & Amorim, 2011).

La identificación de los STRs en el cromosoma X fue iniciada en la década de 1990, (Mahtani & Willard, 1993); y se identificaron una amplia variedad de marcadores STRs para el cromosoma X. En genética forense se utilizan actualmente alrededor de 39 marcadores (Machado Filipe Brum, 2009), siendo óptima para la identificación de mujeres, para quienes el poder de discriminación fue similar al logrado con los STR autosómicos; pero en los casos de identificación de hombres, este poder de discriminación se reduce considerablemente (Desmarais, Zhong, Chakraborty, Perreault, & Busque, 1998). A continuación se muestran algunos de los marcadores STRs identificados en el cromosoma X, indicándose para cada uno el poder de exclusión.

Marcador	Localizacion citogenetica	Poder de exclusión
DXS8378	Xp22.31	0.3998
DXS9902	Xp22.2	0.3811
DXS7132	Centromero	0.5140
DXS10079	Xq12	0.6469
DXS10074	Xq12	0.6845
DXS10075	Xq12	0.3815
DXS9898	Xq21.31	0.5148
DXS6801	Xq21.32	0.3017
DXS6809	Xq21.33	0.5894
DXS6789	Xq21.33	0.4211
DXS6799	Xq21.33	0.3405
DXS7133	Xq22.3	0.3566
GATA172D05	Xq23	0.5642

Tabla 4.4 marcadores STR para el cromosoma X. Modificado de (Castañeda Fernandez, 2013; Siza Fuentes, L., Sanchez, D. Gomez, Y. Restrepo, C. M. Gutierrez, A. Fonseca, 2010).

4.7.2 Cromosma Y

Al mismo tiempo que se descubrian marcadores STRs para el cromosoma X, se identificaron otros STRs para el cromosoma Y, tales como DYS19 y otros (Roewer & Epplen, 1992). Se han documentado unos 200 STRs en the Human Genome Database (J M Butler, 2003). El conjunto de marcadores del cromosoma Y permitió construir lo que se llama el “HAPLOTIPO MINIMO” que permite identificar y/o establecer el linage en individuos de sexo masculino (Kayser et al., 1997), los cuales se encuentran incluidos en algunos de los *kits* comerciales de indentificacion disponibles a la fecha tabla 4.5.

Marcador	Tamaño pb	Diversidad de gen afro-americanos	Diversidad de gen caucásicos	Diversidad de gen hispanos
DYS458	303	0.755	0.808	0.77
DYS19	194	0.748	0.541	0.645
DYS385a/b	271	0.951	0.855	0.931
DYS391	274	0.423	0.54	0.53
DYS393	119-139	0.0.619	0.412	0.507
DYS439	297	0.629	0.663	0.665
(Y-GATA-A4)				
DYS635	374	0.701	0.682	0.71
(Y-GATA-C4)				
DYS392	248	0.419	0.615	0.671
Y GATA H4	581	0.599	0.604	0.575
DYS437	117-125	0.495	0.624	0.583
DYS438		0.528	0.622	0.712
DYS448	509	0.685	0.651	0.726

Tabla 4.5 Marcadores disponibles en estuches comerciales para el análisis del cromosoma Y.

Tomado de (Applied Biosystems, 2012; Mulero et al., 2006).

4.7.3 AMEL X, AMEL Y

De la misma manera que los STR en los cromosomas X y Y permiten la identificación del género, otros marcadores tomaron fuerza para cumplir con este propósito, éste es el caso de la amelogenina. La amelogenina es una proteína que hace parte del esmalte dental y cuyo gen se encuentra localizado en los cromosomas sexuales, en el cromosoma X *AMELX* se halla en Xp22.2, y codifica un fragmento de 2.872 pb; en el cromosoma Y el gen *AMELY* se localiza en Yp11.2 y presenta un fragmento mayor de 3.272 pb (Sasaki & Shimokawa, 1995). El análisis de forma simultánea de estos dos genes permite una identificación precisa del sexo del individuo salvo excepciones como mutaciones o mujeres

embarazadas, este último caso debido a la presencia de sangre fetal (Francès, Castelló, & Verdú, 2008).

4.8 ADN mitocondrial (mitADN)

Dada la segregación a través de linajes maternos, se encontró que el ADN mitocondrial puede también ser utilizado como marcador de identificación (J M Butler & Levin, 1998), debido al mecanismo de herencia de este material genético, el cual es heredado directamente por línea materna; es decir todos los individuos de un mismo linaje materno, poseerán el mismo material genético mitocondrial.

El ADN mitocondrial está contenido en un cromosoma circular que tiene un ciclo de replicación independiente con respecto al ADN genómico; es altamente variable y presenta generalmente homoplasma. La relevancia del mitADN en identificación humana radica en el origen netamente materno, es decir que su genoma no es el resultado de una combinación del material genético de ambos padres, como ocurre con el ADN genómico (Barreto, Vago, Ginther, Simpson, & Pena, 1996).

El mitADN consta de una secuencia de 16.569 bp, con dos regiones variables localizadas dentro de la región llamada D-loop, que son HV1 y HV2, con un tamaño aproximado de 1.122 bp, que se usa para el propósito de identificación (J M Butler & Levin, 1998). El perfil individual de mitADN está organizado a partir de haplotipos. Los haplotipos se heredan de forma conjunta y, un conjunto de haplotipos, conforman un haplogrupo, el cual es asignado a partir de SNPs o variantes de secuencia encontradas en la región (Brandstätter, Parsons, & Parson, 2003).

El proceso para realizar el análisis de las muestras de material genético, inicia con la extracción, cuantificación del ADN, amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, y

finaliza con la detección de los marcadores en estudio, este proceso tiene una duración entre 2.5 a 8 horas (A. Foster & Laurin, 2012), en la actualidad existen varios estuches comerciales que permiten realizar su identificación, entre ellos se pueden mencionar *IdentiFiler*, *PowerPlex*, *GlobalFiler* y *GlobalFiler Express* (Collins et al., 2004).

4.9 Polimorfismos de nucleótido único –*Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*-

Los SNPs, han comenzado a tener una participación como marcadores para la identificación humana, debido a su baja tasa de mutación que se encuentra en el orden de 1.2×10^{-8} y a la longitud de sus amplicones, que generalmente no supera las 100 bp, que lo hace un método adecuado para el análisis de muestra de ADN degradado (J. J. Kim, Han, Lee, Yoo, & Lee, 2010), sin embargo su poder de discriminación es bajo, debido a su naturaleza bialélica, que obliga a la utilización de un gran número de loci (Hiroaki et al., 2015).

4.10 Pruebas de filiación

En Colombia una de las principales aplicaciones de las pruebas de identificación, es establecer o impugnar una relación filial entre padre-hijo, madre-hijo o padre-madre-hijo, esta indicación se encuentran reglamentadas bajo la ley 75 de 1968, la ley 721 de 2001 en el caso del establecimiento de la relación filial y la ley 1060 de 2006 para el caso de la impugnación. La ley 721 de 2001 indica que para establecer una relación de paternidad o maternidad, se debe practicar exámenes científicos que permitan alcanzar un índice de probabilidad superior al 99.9%; de la misma forma menciona que la técnica de análisis de ADN a través de marcadores genéticos es la indicada para alcanzar el porcentaje de certeza requerido (Republica de Colombia, 2001).

Otro aspecto tratado en la ley 721 de 2001, es el establecimiento de filiación cuando alguno de los implicados están ausentes, ya sea por fallecimiento, o desaparición, en este caso para lograr establecer una probabilidad de parentesco, la prueba debe alcanzar un valor mínimo del 99.99%.

Se han establecido parámetros para el desempeño de los laboratorios que practican dichas pruebas (Giraldo, 2006), a partir de la creación de la Comisión de Acreditación y Vigilancia con el propósito de garantizar la eficiencia, veracidad y transparencia de las pruebas con marcadores genéticos de ADN, esta comisión se encuentra reglamentada a través del decreto 1562 del 24 de julio de 2002; finalmente todos los laboratorios que prestan sus servicios para la realización de pruebas genéticas deben estar certificados y acreditados de acuerdo a los parámetros establecidos en el decreto 2112 de 2003.

La verificación de una relación filial está enmarcada de acuerdo con la facilidad desde el punto de vista técnico o de cálculos probabilísticos para establecer el parentesco entre los individuos en estudio; por ello se han clasificado como casos simples y casos complejos. Los casos simples son aquellos en los cuales se busca establecer un parentesco entre un supuesto padre, un hijo y una madre, estos son denominados tríos. Por otro lado se encuentran los casos complejos, los cuales buscan establecer la relación filiar pero en esta oportunidad hay ausencia de alguno de los padres, por lo que será necesario establecer la relación con esta línea parental de forma indirecta, es decir con la participación de otros familiares como por ejemplo abuelos, medios hermanos o tíos (Ortega Torres, 2015).

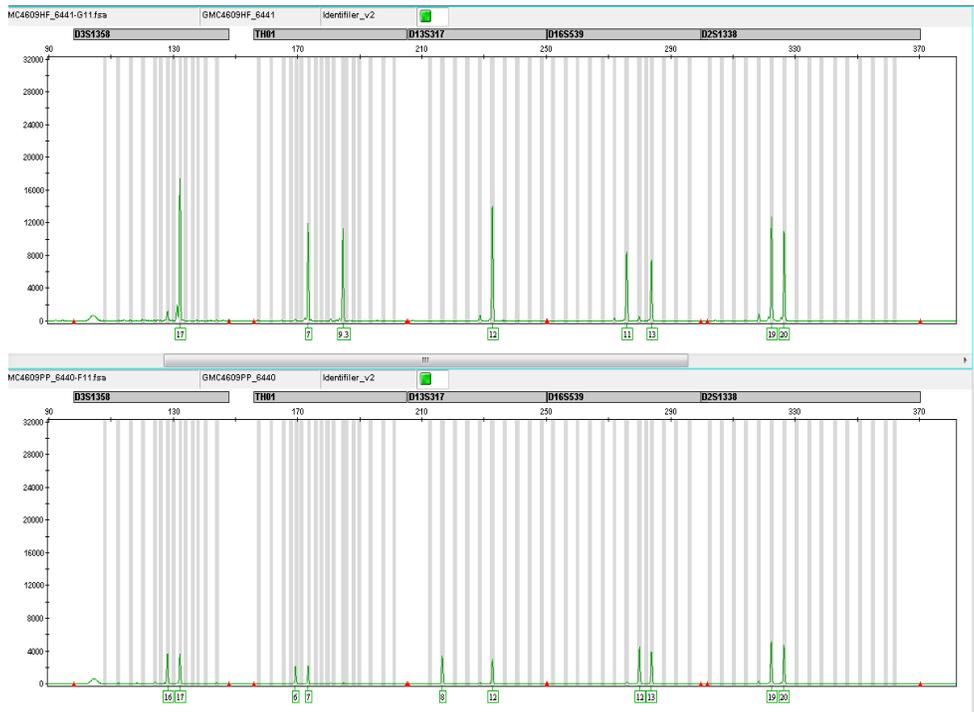
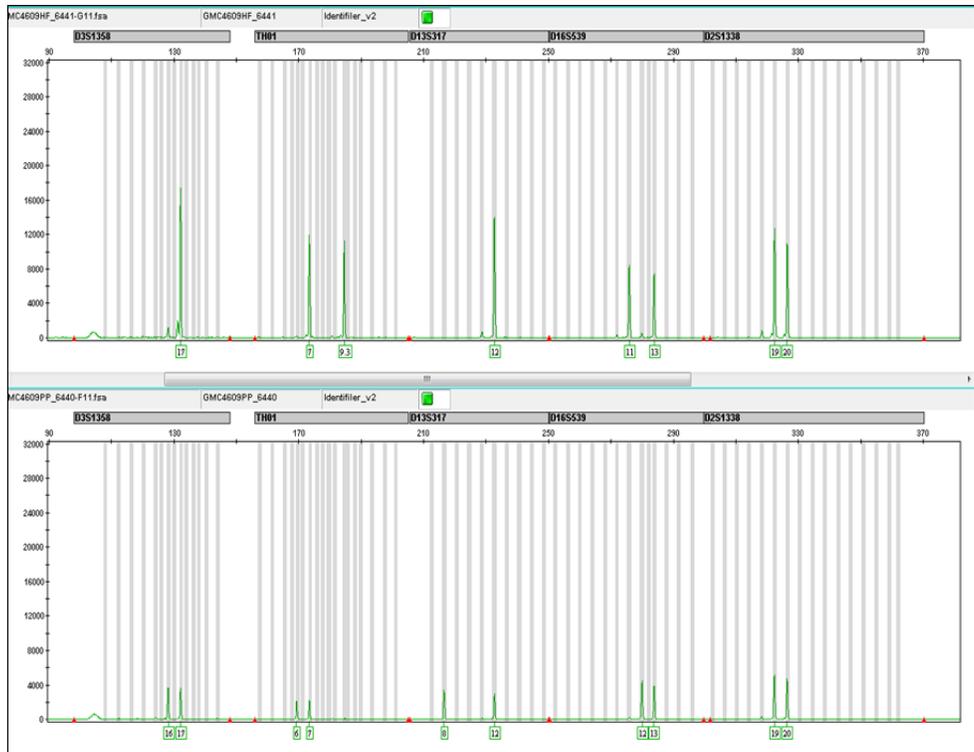
El proceso para la realización de una prueba de filiación comienza con la identificación de los participantes, diligenciamiento de un formato donde se consignan datos personales, dentro de los cuales tiene como relevancia antecedentes de transfusiones o trasplantes de médula ósea, debido a que estos procedimientos alteran el perfil genético del receptor ocasionando falsos positivos o

negativos; finalmente la firma del consentimiento informado y la obtención de muestras para la extracción del ADN, que pueden ser de sangre venosa, la más utilizada para estos estudios; otras fuentes pueden ser líquidos amniótico, células de la mucosa oral obtenidas por medio de hisopos, cabello, tejidos o restos óseos.

Luego de obtener las muestras, estas son rotuladas con códigos, para anonimizarlas y se inicia una cadena de custodia, con el fin de evitar cambios, interferencias o alteraciones durante el proceso; posteriormente se realiza la extracción de ADN por medio de diferentes métodos, los cuales son aplicados acorde al tipo de muestra, en el caso de sangre venosa, se utiliza el método de *salting out*; para muestras de cabello se utiliza el método de hidróxido de sodio y para muestras de hueso se usa el método de fenol-cloroformo. Seguido de este proceso, se amplifica un número de marcadores genéticos localizados en el ADN a partir de la muestra inicial de ADN, lo cual se hace a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*), este método permite obtener miles de copias del ADN de interés.

Seguido, el ADN amplificado es llevado a un sistema automatizado de electroforesis, el cual permite la separación de los distintos marcadores genéticos para su correcta individualización, la cual es realizada a través de un sistema óptico acoplado a un *software*. Éste permite identificar cada uno de los fragmentos presentes para cada marcador genético o STR; de esta forma se estructura un perfil genético de cada uno de los participantes del estudio de filiación y se emite un resultado gráfico que permite hacer la comparación entre los perfiles genéticos.

A continuación se muestran imágenes de las gráficas resultantes del análisis electroforético en unas pruebas de filiación, indicando cada uno de los marcadores STR evaluados y sus resultados para el binomio hijo(a) - supuesto padre, es de anotar que el análisis electroforético se hace de forma independiente para cada uno de los participantes y las imágenes no son anexadas en el reporte



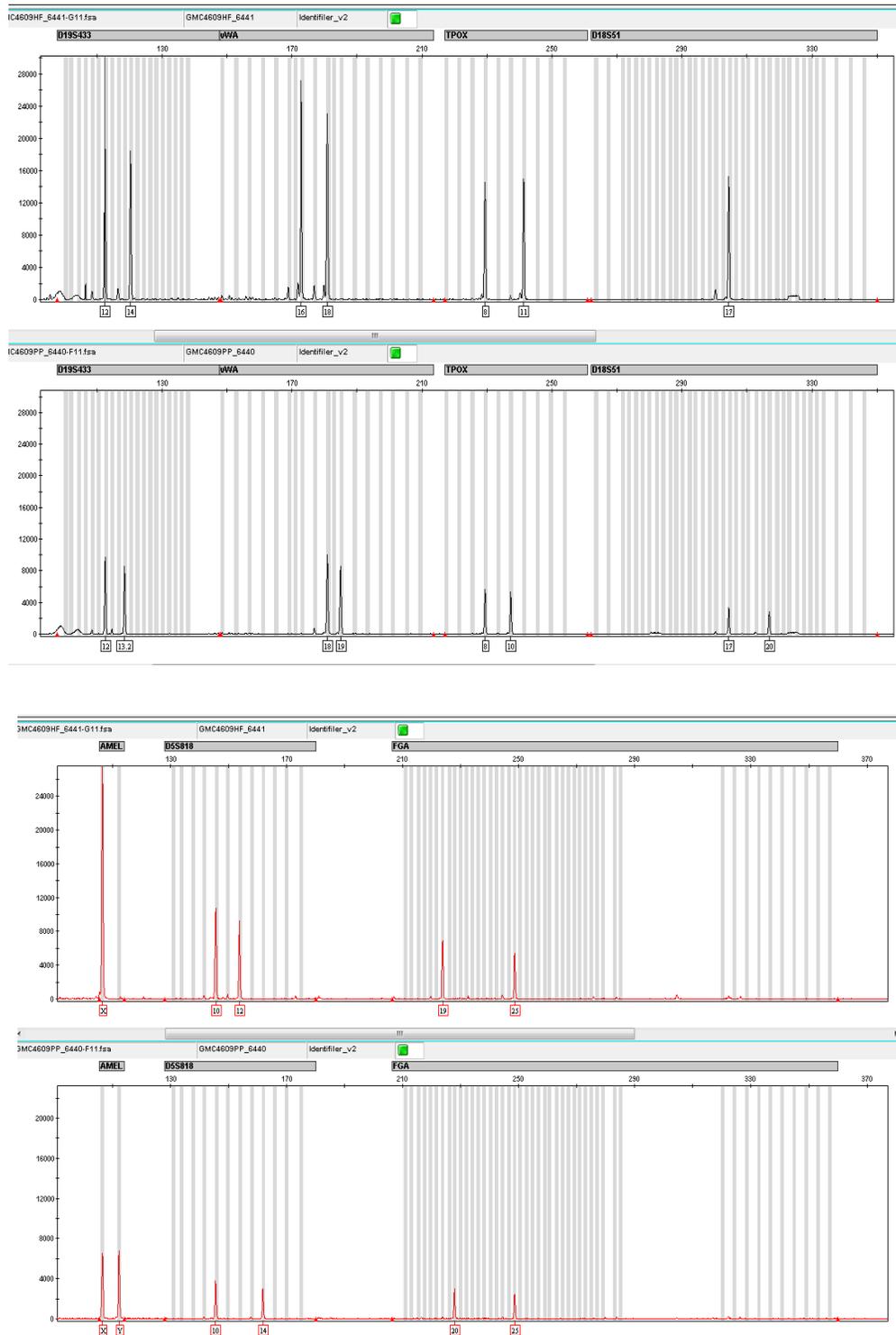
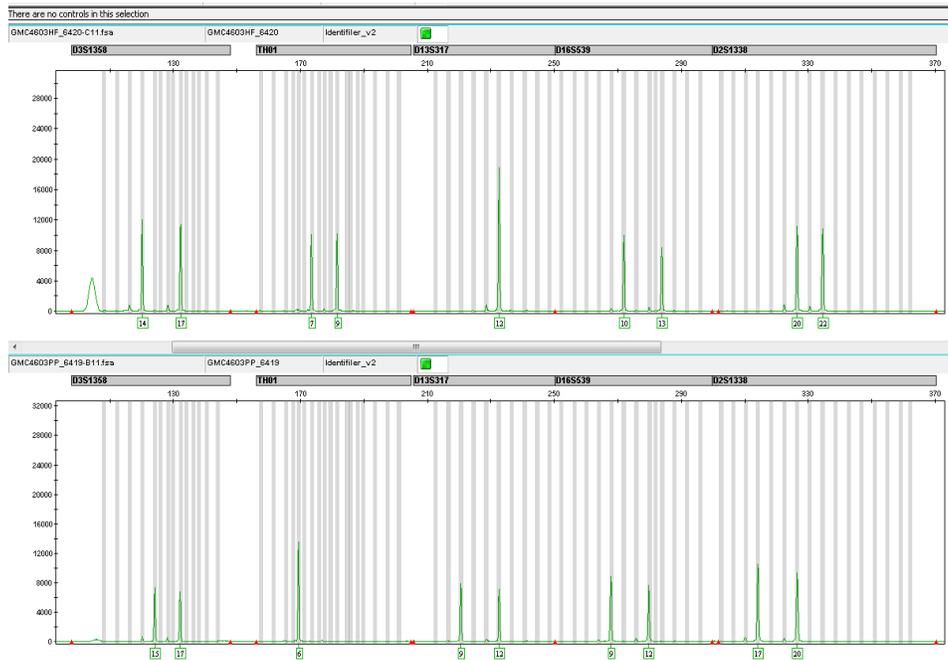
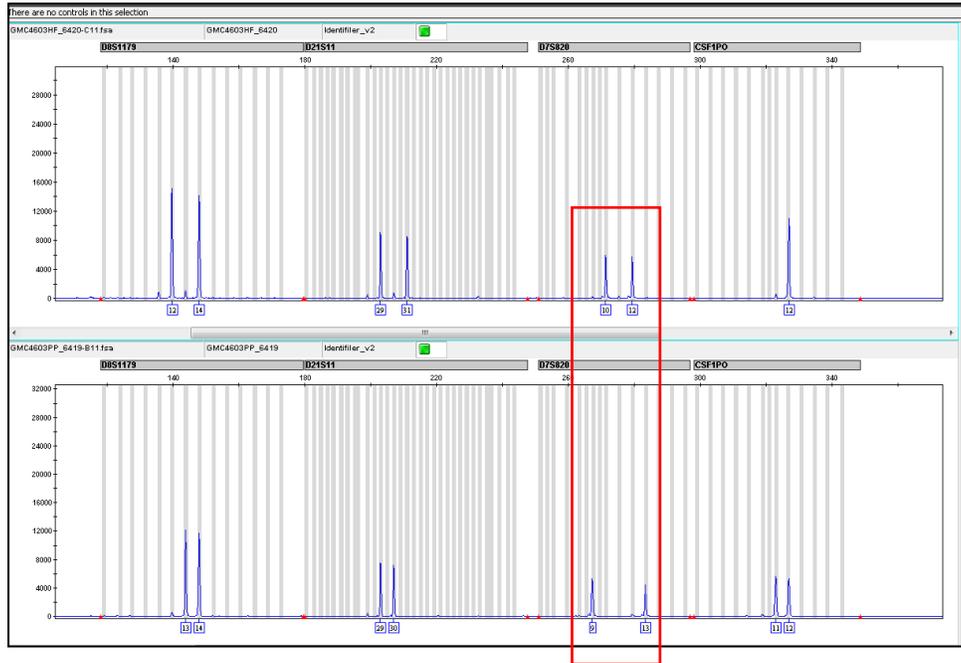


Imagen 4.2. Prueba de filiación binomio hija – supuesto padre; se evalúan 15 marcadores STR y un marcador AMEL adicional para determinar el sexo; el resultado de la prueba muestra concordancia en los 15 marcadores STR y presencia del marcador AMELX, indicando sexo femenino, de esta forma

se puede determinar la NO EXCLUSION de la paternidad. Cortesía de la doctora Luz Miryam Siza, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.



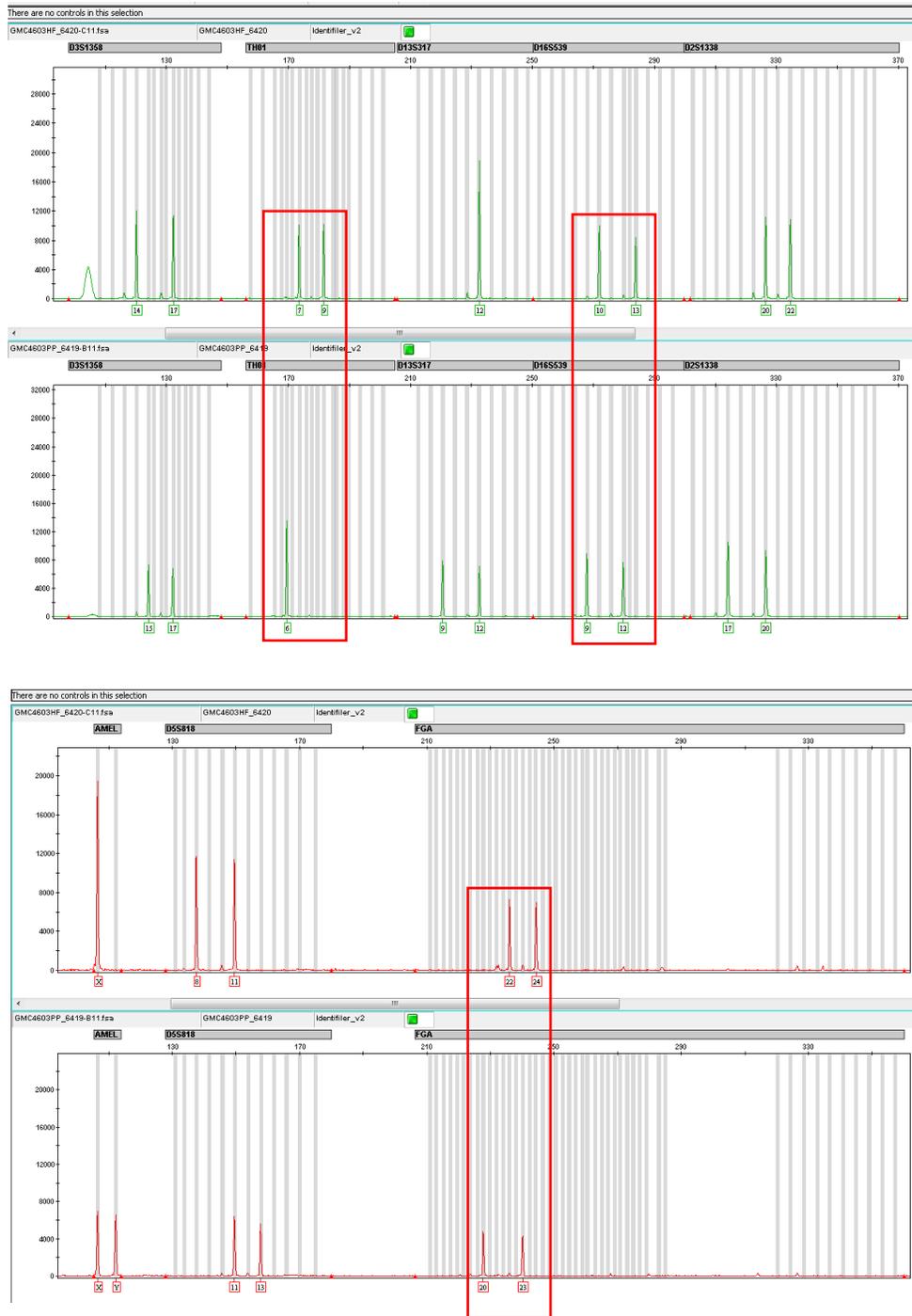


Imagen 4.3. Prueba de filiación binomio hija – supuesto padre; se evalúan 15 marcadores STR y un marcador AMEL adicional para determinar el sexo; el resultado de la prueba muestra no concordancia en 7 de los 15 marcadores STRs (recuadros rojos); la presencia del marcador AMELX,

indica sexo femenino. Con este resultado se puede determinar la EXCLUSIÓN de la paternidad.

Cortesía de la doctora Luz Miryam Siza, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

Con el perfil genético se puede realizar una primera aproximación para establecer una relación filial, a partir del número de coincidencias entre los marcadores genéticos presentes en el hijo y los marcadores del padre en el caso de una prueba de paternidad, esto partiendo del número de STRs disponibles en el estuche de análisis de marcadores genéticos; cuando todos los marcadores genéticos analizados en el hijo coinciden con el supuesto padre, acorde a lo descrito en la primera regla de Landsteiner (Navalpotro Molina, 2014) y se indica NO EXCLUSIÓN de la paternidad; por otro lado cuando se observa no concordancia de 3 marcadores entre el hijo y el padre, se indica EXCLUSIÓN de la paternidad, en el caso que el número de marcadores no concordantes entre supuesto padre e hijo sea de uno o dos, será calculada la probabilidad de paternidad, sin tener en cuenta estos marcadores (Ranjit Chakraborty & Stivers, 1996); o se realizará el cálculo estadístico de mutación para el marcador donde se evidencia la exclusión.

4.10.1 Cálculos matemáticos en pruebas de filiación

Con los resultados de los perfiles genéticos, se procede a realizar un análisis matemático, con el propósito de dar solidez estadística a los resultados, esto se cumple con el cálculo de la probabilidad de paternidad (W) y el índice de paternidad (IP). La probabilidad de paternidad (W) indica cual es la posibilidad que un hombre determinado pueda ser el padre biológico de un hijo, mientras que el índice de paternidad (IP) refleja cuantas veces el supuesto padre es identificado como padre biológico cuando le compara con un hombre de la población elegido al azar (Restrepo, 2006).

El índice de paternidad (IP) se determina a través de la fórmula X/Y , donde X representa la probabilidad que el padre herede uno de sus alelos al hijo y Y representa la probabilidad que el alelo que aporta el supuesto padre, pertenezca a otro hombre de la población. El valor de X es el resultado de multiplicar la probabilidad de heredar uno de los alelos del supuesto padre (AC) por la probabilidad de heredar un alelo la madre; para determinar la probabilidad de heredar un alelo se tiene en cuenta si el alelo es homocigoto o heterocigoto. La probabilidad es de 1 cuando el supuesto padre o madre son homocigoto por ejemplo tiene dos alelos A (AA), cuando es heterocigoto la probabilidad es de 0.5, debido a que el supuesto padre posee dos alelos distintos y puede heredar uno solo de ellos por ejemplo (AB), cuando los alelos que posee el supuesto padre no han sido identificados en el hijo, se toma como 0 (cero) esta probabilidad.

Figura 4.3. Fórmula para determinar el índice de paternidad (IP)

$$X = A \times B$$

A = (probabilidad de heredar el alelo materno)
B = (probabilidad de heredar el alelo del supuesto padre)

Como ejemplo se puede tomar el análisis del marcador D8S1179, en un caso compuesto por madre, hijo y un supuesto padre, el cual puede ser denominado trio, a continuación se listan los resultados

Fuente de la muestra	alelos
Madre	8/11
Hijo	8/13
Supuesto padre	10/13

Tabla 4.6 Ejemplo de segregación de alelos.

Como se puede observar el hijo y el supuesto padre comparten el alelo 13, si se tiene en cuenta que el supuesto padre es heterocigoto para sus alelos, la probabilidad que tiene de heredar o uno o el otro es del **0.5**; de la misma forma la madre al ser heterocigota tiene una probabilidad de heredar uno de sus alelos igual a **0.5**, de esta forma se puede establecer el valor de X al multiplicar estas dos probabilidades

$$X = 0.5 \times 0.5 = 0.25$$

Para establecer el valor de Y, se multiplica la frecuencia poblacional de cada uno de los alelos identificados por los STR que comparte con el supuesto padre, por la probabilidad de heredar un alelo materno. Para conocer las frecuencias alélicas se debe recurrir a registros o tablas poblacionales, en Colombia las frecuencias de estos marcadores se toman de acuerdo con la región de nacimiento del hijo, Colombia se encuentra dividido en 4 regiones a saber: región caribe, región choco, región andina y región andina suroccidental (Paredes et al., 2003).

Figura 4.4. Fórmula para determinar el valor de Y

$$Y = C \times D$$

C = (frecuencia poblacional del alelo que comparte con el supuesto padre)

D = (la probabilidad de heredar un alelo de la madre)

Retomando el ejemplo, la frecuencia poblacional del alelo 13 en la región caribe donde nació el hijo es de 0.333 y la probabilidad de heredar un alelo materno es de 0.5, se obtiene el valor de Y.

$$Y = 0.333 \times 0.5 = 0.1665$$

Con los resultados obtenidos del valor de X y el valor de Y, se puede establecer el índice de paternidad (IP) para este marcador en específico.

$$IP = 0.25/0.1665 = 1.5015$$

Este resultado permite establecer que el supuesto padre es 1,5015 veces el padre biológico, cuando se compara con otro hombre escogido al azar y que posea el alelo 13.

El índice de paternidad es establecido en cada uno de los marcadores genéticos, para establecer un índice de paternidad total o global que es el valor final que va a establecer el número de veces que el supuesto padre puede ser identificado como padre biológico con respecto a un hombre de la población elegido al azar, se debe multiplicar cada uno de los IP cada STR que hacen parte del estuche de análisis genético.

Por ejemplo, se analizan nueve marcadores genéticos se obtiene su IP individual los cuales con 1.7738, 2.3498, 2.0722, 4.0865, 3.0603, 3.0323, 2.0215, 1.0724, 2.1217; estos IP se multiplican entre ellos $1.7738 \times 2.3498 \times 2.0722 \times 4.0865 \times 3.0603 \times 3.0323 \times 2.0215 \times 1.0724 \times 2.1217$

= 1506.500978949557 y este valor es el número de veces que el supuesto padre es el padre biológico.

Para establecer la probabilidad de paternidad (W), se divide el índice de paternidad total (IPT) sobre el índice de paternidad (IP) total + 1 y ese resultado se multiplica por 100.

Figura 4.5. Fórmula para establecer la probabilidad de paternidad (W).


$$W = \{IPT/(IPT + 1)\} \times 100$$

Continuando con el ejemplo anterior el índice de paternidad total es de 1506.500978949557, el cálculo es el siguiente $W = 1506.500978949557 \div 1507.500978949557 = 0.999336650$; este

resultado lo multiplicamos x 100; $0.999336650 \times 100 = 99.93\%$, de esta forma se establece que la probabilidad que el supuesto padre sea el padre biológico es cercano a 100 %.

3 RESULTADO

Marcador	PRESUNTO PADRE		HIJA		Frecuencias Hijo		Resultado	X	Y	IP
CSF1PO	10	11	11	11	0,2970	0,2970	NO EXCLUSION	0,15	0,0882	1,6835
D13S317	8	12	12	12	0,2950	0,2950	NO EXCLUSION	0,15	0,0870	1,69492
D16S539	12	13	11	13	0,2660	0,1190	NO EXCLUSION	0,13	0,0633	2,10084
D18S51	17	20	17	17	0,1490	0,1490	NO EXCLUSION	0,07	0,0222	3,35571
D19S433	12	13,2	12	14	0,0621	0,3172	NO EXCLUSION	0,16	0,0394	4,02576
D2S1338	19	20	19	20	0,2276	0,1379	NO EXCLUSION	0,18	0,0628	2,91132
D21S11	30	30	30	30	0,2930	0,2930	NO EXCLUSION	0,29	0,0856	3,41297
D3S1358	16	17	17	17	0,1390	0,1390	NO EXCLUSION	0,07	0,0193	3,59712
D5S816	10	14	10	12	0,0730	0,2560	NO EXCLUSION	0,13	0,0374	3,42466
D7S820	10	11	10	12	0,2810	0,1740	NO EXCLUSION	0,09	0,0978	0,88968
D8S1179	13	13	13	14	0,3330	0,2510	NO EXCLUSION	0,25	0,1672	1,5015
FGA	20	25	19	25	0,0660	0,1490	NO EXCLUSION	0,03	0,0197	1,67785
TH01	6	7	7	9,3	0,2460	0,1790	NO EXCLUSION	0,09	0,0881	1,01626
TPOX	8	10	8	11	0,5050	0,2630	NO EXCLUSION	0,13	0,2656	0,49505
vWA	18	19	16	18	0,3580	0,1650	NO EXCLUSION	0,18	0,1181	1,51515

*-P: Padre incompatible, -M: Madre incompatible, -P2: Exclusión de 2º Orden paterna, -M2: Exclusión de 2º Orden materna.

4 INTERPRETACION Y CONCLUSIÓN

Índice de Paternidad (Relación de Paternidad contra cualquier PP de la población)	16,936 : 1
Probabilidad de Paternidad	99,99409568836491%

A.

3 RESULTADO

Marcador	PRESUNTO PADRE		HIJA		Frecuencias Hijo		Resultado	X	Y	IP
CSF1PO	11	12	12	12	0,3640	0,3640	NO EXCLUSION	0,18	0,1325	1,37363
D13S317	9	12	12	12	0,2950	0,2950	NO EXCLUSION	0,15	0,0870	1,69492
D16S539	9	12	10	13	0,1590	0,1190	-P	0,00	0,0378	FALSO
D18S51	13	16	12	17	0,1260	0,1490	-P	0,00	0,0375	FALSO
D19S433	14	14	11	13	0,0052	0,1603	-P	0,00	0,0017	FALSO
D2S1338	17	20	20	22	0,1379	0,0741	NO EXCLUSION	0,04	0,0204	1,81291
D21S11	29	30	29	31	0,2070	0,0670	NO EXCLUSION	0,03	0,0277	1,20773
D3S1358	15	17	14	17	0,1010	0,1390	NO EXCLUSION	0,05	0,0281	1,79856
D5S816	11	13	8	11	0,0080	0,4180	NO EXCLUSION	0,00	0,0067	0,59809
D7S820	9	13	10	12	0,2810	0,1740	-P	0,00	0,0978	FALSO
D8S1179	13	14	12	14	0,1220	0,2510	NO EXCLUSION	0,06	0,0612	0,99602
FGA	20	23	22	24	0,1350	0,1690	-P	0,00	0,0456	FALSO
TH01	6	6	7	9	0,2460	0,1170	-P	0,00	0,0576	FALSO
TPOX	8	11	8	11	0,5050	0,2630	NO EXCLUSION	0,38	0,2656	1,44562
vWA	14	17	15	18	0,0890	0,1650	-P	0,00	0,0294	FALSO

B.

Imagen 4.4. Resultados del cálculo matemático realizado para los marcadores mostrados con anterioridad en **A**. El resultado NO EXCLUYE LA PATERNIDAD, con una probabilidad de paternidad de 99.99% y un índice de paternidad de 16.936:1; **B**. El resultado EXCLUYE LA PATERNIDAD, en 7 de 15 STR analizados. Cortesía de la doctora Luz Miryam Siza, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

Ya con estos dos resultados, se emite un informe, indicando si se excluye o no se excluye como

padre biológico al supuesto padre. Vale la pena recordar que es un resultado NO EXCLUYENTE de paternidad cuando la prueba tiene un índice de paternidad >1000 y una probabilidad de paternidad mayor de $>99.9\%$, de acuerdo con lo estipulado por las leyes de la república, y teniendo en cuenta los predicados verbales de Hummel (Restrepo-Fernández, 2007), que expresan el grado de certeza racional en una prueba positiva; cualquier valor de la probabilidad de paternidad que sea superior a 99.73% , puede ser considerada como un paternidad prácticamente probada. Ante un resultado de no concordancia de por lo menos 3 marcadores STRs la prueba es interpretada como EXCLUYENTE de paternidad.

4.10.2 Informe del resultado de la prueba de filiación

El informe debe contener entre otros, los datos de identificación de los participantes en las pruebas de filiación, la lista de los marcadores STRs analizados, los alelos obtenidos en cada uno de los participantes, el valor de IP de cada uno de los STRs, el índice de paternidad total y la probabilidad de paternidad; adicionalmente a esta información, se debe citar una interpretación de los resultados donde se indique claramente si se excluye o no a un padre como padre biológico.

Finalmente se debe indicar los valores de referencia para el índice de probabilidad el cual debe ser ≥ 1.000 y para la probabilidad de paternidad que debe ser $\geq 99.9\%$ y que sirvieron para establecer

la conclusión, al término del informe se debe relacionar los profesionales encargados de realizar la prueba y sus respectivas firmas avalando el informe.



Figura 4.6 Esquema del informe con los resultados de la prueba de filiación.

4.10.3 Casos complejos en filiación

El segundo grupo de casos para establecer filiación son los casos complejos, en ellos se busca establecer una relación de parentesco cuando uno de los padres ha fallecido o desaparecido; como se había mencionado con anterioridad, los requisitos técnicos son mayores, debido a la necesidad de utilizar un número mayor de marcadores genéticos, además de esto es indispensable incluir dentro del grupo de análisis a otros familiares idealmente de primer grado de la persona ausente, estos pueden ser los padres, hermanos o hijos previamente reconocidos, para establecer un criterio de exclusión o no exclusión el índice de paternidad debe ser de >99.99% (Republica de Colombia, 2001), siendo este más estricto que para los casos simples.

4.11 Conclusión

En resumen se puede observar el largo recorrido que han transitado los diferentes métodos para la identificación humana, que se inició con la caracterización de los sistemas de grupos sanguíneos y el sistema Rh, los cuales tenían una capacidad de identificación muy baja; con la modernización de diferentes técnicas y la utilización de otros marcadores biológicos, como las proteínas séricas, los polimorfismos cromosómicos y el antígeno leucocitario humano, esta capacidad de identificación fue aumentando progresivamente; luego del advenimiento de las técnicas moleculares que permiten el estudio del ADN. Con ello técnicas como *fingerprinting* y finalmente el análisis de los marcadores STR, permitieron alcanzar niveles de identificación cercanos al 100%, siendo estos últimos los que en la actualidad se usan no solo con propósito de identificación, sino también para el establecimiento de relaciones filiales.

5. PRUEBAS DE CRIBADO

5.1 Generalidades

La expresión cribado es definido como “la presunta identificación de una enfermedad o defecto no reconocido a través de la aplicación de pruebas, exámenes o procedimientos rápidos” (Wilson & Jungner, 1968a). Un método de cribado busca la detección temprana de aquellas personas que, sin tener conocimiento que pueden ser afectados por una patología, sean identificados y sean susceptibles de intervención. Las pruebas de cribado por lo general no son métodos de diagnóstico; por esa razón, aquellas personas que resultan positivas en la prueba cribado, se les debe aplicar la prueba diagnóstica específica para su condición (Morabia & Zhang, 2004).

El cribado es clasificado en:

TIPO DE CRIBADO	CARACTERISTICAS
Cribado de masas (poblacional)	Método aplicado a todo un grupo poblacional
Cribado selectivo	Método aplicado a grupos de alto riesgo
Cribado múltiple o multifásico	Aplicación de dos o más métodos de cribado a una gran población.
Vigilancia	Observación o seguimiento cercano y continuo
Hallazgo de caso	Detección de pacientes e inicio de tratamiento
Encuestas epidemiológicas	Elucidar la prevalencia, incidencia e historia natural de la(s) variable(s) en estudio

Tabla 5.1. Tipos y características del cribado, adaptado de (Wilson & Jungner, 1968b).

Las pruebas candidatas a ser establecidas como pruebas de cribado deben cumplir una serie de criterios que se muestran en la Tabla 5.2 (Wilson & Jungner, 1968a):

Criterio	Descripción
Analice una patología con impacto como problema de salud	Enfermedad con alta prevalencia dentro de la sociedad o que modifique considerablemente la salud del afectado
Selección de la prueba de cribado	La prueba seleccionada debe tener validez y ser reproducible
Presencia de un método de diagnóstico confirmatorio	La patología debe contar con un método confirmatorio preciso y sensible para identificar de forma definitiva la condición.
Sintomatología precoz o estado de latencia reconocible	Idealmente, la historia natural de la enfermedad debe permitir reconocer etapas tempranas de la misma, o estados de poca evolución, que permitan aplicar la prueba de cribado
Aceptación del método	La prueba de cribado debe ser aceptada por la comunidad. Los riesgos deberán ser mínimos y la forma de aplicación no genera incomodidad o rechazo.
Tratamiento disponible para la condición	La condición evaluada debe idealmente tener tratamiento.
Consideraciones económicas	El método debe ser económico para poder ser usado en un conjunto de personas.

Tabla 5.2. Criterios para las pruebas de cribado, modificado de (Galván B., 2009)

Para utilizar una prueba de cualquier tipo, incluyendo una prueba genética como un método de cribado, debe cumplir con parámetros de validez que se basan en determinar la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo de la prueba.

La sensibilidad es entendida como la proporción de casos positivos que son identificados por una prueba; de la misma forma, la especificidad es la proporción de resultados negativos identificados cuando la enfermedad está ausente (Altman & Bland, 1994). Los valores predictivos positivo y

negativo describen la probabilidad que tiene un paciente de tener la enfermedad una vez los valores de la prueba son conocidos; de esta forma, el valor predictivo positivo de una prueba es definido como la probabilidad de presentar la enfermedad cuando el resultado de la prueba es positivo, y el valor predictivo negativo hace referencia a la probabilidad que no se tenga la enfermedad cuando el resultado de prueba sea negativo, es decir cuando realmente no están enfermas (Akobeng, 2007).

	POBLACIÓN CON LA ENFERMEDAD	POBLACIÓN SIN LA ENFERMEDAD
RESULTADO DE LA PRUEBA POSITIVO (+)	Verdadero positivo (VP)	Falso positivo (FP)
RESULTADO DE LA PRUEBA NEGATIVO (-)	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (VN)

Tabla 5.3. Valores predictivos, modificada de (Galván B., 2009)

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

5.2 Aplicación de las pruebas de cribado

Los primeros registros sobre la aplicación de pruebas de cribado datan desde los comienzos del siglo XX. En el año 1900 se tomaron niveles de glucosa en orina en 71 mil personas para determinar la prevalencia de glucosuria en hombres. En la década de 1940 se realizó un estudio a gran escala en la ciudad de Oxford (Massachusetts), para determinar la prevalencia de diabetes en una comunidad típica, a través de la medición de glucosa en orina; cuando la prueba de glucosuria resultaba positiva, se solicitaba una prueba confirmatoria en sangre de la persona para establecer el diagnóstico de

Diabetes Mellitus (Morabia & Zhang, 2004). En este estudio se encontró una prevalencia de diabetes cercana al 2% de la población y los hallazgos permitieron iniciar en algunos casos el tratamiento.

Otros ejemplos de cribado son los realizados en enfermedades como el cáncer de cérvix, el cáncer de mama en las mujeres a través de la prueba de Papanicolaou y/o el autoexamen de la mama o las pruebas para desordenes psiquiátricos realizados por el ejército de los Estados Unidos de América, para determinar el ingreso de personal a sus filas, los cuales se encuentran dentro de los primeros en ser realizados con características de cribado (J. T. Cox, 2009; Russell & Butkus, 2014).

5.3 Tipos de pruebas de cribado

Las pruebas de cribado se pueden realizar a cualquier edad y se pueden denominar como pruebas de cribado prenatales y posnatales.

Las pruebas de cribado realizadas en el periodo prenatal persiguen evidenciar en el embrión o feto la presencia de una condición anatómica, genética, funcional o metabólica, seguidas o no de intervenciones específicas antes que los síntomas de la enfermedad se manifiesten, configurando de esta forma una forma de prevención secundaria.

Las pruebas de cribado posnatal se pueden dividir en dos grupos: en el primer grupo están las que se realizan durante la etapa neonatal para reconocer signos en el recién nacido; son métodos de prevención secundaria o, en algunos casos mediante el tratamiento del nacido, se usan como prevención terciaria. En el segundo grupo están aquellas que se realizan en etapas como la niñez, la juventud o la adultez y pueden incluir pruebas de portadores, pruebas específicas para grupos étnicos, entre otras. (Rowley & Saller, 2001).

5.4 Primeras pruebas de cribado en genética

Una de las primeras condiciones genéticas en ser cribada fue la fenilcetonuria, enfermedad genética con herencia autosómica recesiva causada por una mutación en el gen *PAH* (*Phenylalanine hydroxylase*), que metaboliza la fenilalanina en tirosina. La pérdida de la función de la proteína PAH produce aumento en la concentración sanguínea de fenilalanina y varios metabolitos que son tóxicos a nivel cerebral y que ocasionan manifestaciones clínicas como deterioro cognitivo, autismo, convulsiones y déficit motor (Blau, Spronsen, & Levy, 2010).

La fenilcetonuria fue descrita en la década de 1930s, cuando Fölling encontró elevación de la fenilalanina y evidenció que al agregar cloruro férrico a la orina de los afectados, ocurría una reacción química que la hacía cambiar a un color verde oscuro (Vela-Amieva, 2011). Con una dieta baja en fenilalanina se observó disminución de los niveles de fenilalanina en sangre, lo cual evitaba los efectos deletéreos, por lo que fue viable la identificación precoz de los niños afectados para mantenerlos libres de los síntomas de la enfermedad. En la década de los años 1960s, Guthrie introdujo una prueba de cribado en sangre para fenilcetonuria, convirtiéndose en política de salud pública en algunos estados de los Estados Unidos de América desde 1963, al finalizar la década de 1980s, la prueba se practicaba en la totalidad de los estados de esa nación (Holtzman, 1999).

En 1963 se comenzó también a realizar la identificación de aneuploidías como la trisomía 21 a través del cariotipo en el líquido amniótico; siete años después se estableció como prueba de cribado prenatal con el fin de identificar la trisomía 21 en mujeres gestantes mayores de 35 años de edad (Khalil, 2006).

5.5 Pruebas de cribado en genética

En la actualidad se existe un amplio espectro de pruebas de cribado para enfermedades genéticas, que utilizan métodos bioquímicos, citogenéticos, moleculares, y otros diseñados de acuerdo con la condición que desea ser tamizada; así mismo es posible encontrar paneles que analizan grupos de genes comunes para un padecimiento en particular o genes asociados a enfermedades con una prevalencia mayor en grupos étnicos específicos.

A continuación se describirán algunas de las pruebas de cribado aplicadas en la identificación de patologías de origen genético, agrupadas de acuerdo al sistema afectado.

5.5.1 Cribado de errores innatos del metabolismo

Los errores innatos del metabolismo (EIM), son patologías mayoritariamente de origen genético que se caracterizan por presentar defectos o alteraciones en las vías metabólicas, ocasionando en algunos casos la acumulación de sustratos y/o el déficit de un producto (Menkes, 2003).

De forma general se puede dividir los errores innatos del metabolismo en:

Aminoacidopatías
Acidemias orgánicas
Enfermedades de depósito lisosomal
Enfermedades de depósito de glicógeno (glucogenosis)
Defectos del metabolismo de los esfingolípidos
Mucopolisacaridosis
Enfermedades peroxisomales
Defectos del ciclo de la urea

Tabla 5.4. Errores innatos del metabolismo (EIM). Adaptado de (Barrera Avellaneda, 2009)

Debido al impacto clínico, social, económico y psicológico de los EIM, en muchos países se han considerado como objetivo básico para la detección masiva en recién nacidos. Para ello se dispone de pruebas cualitativas y cuantitativas.

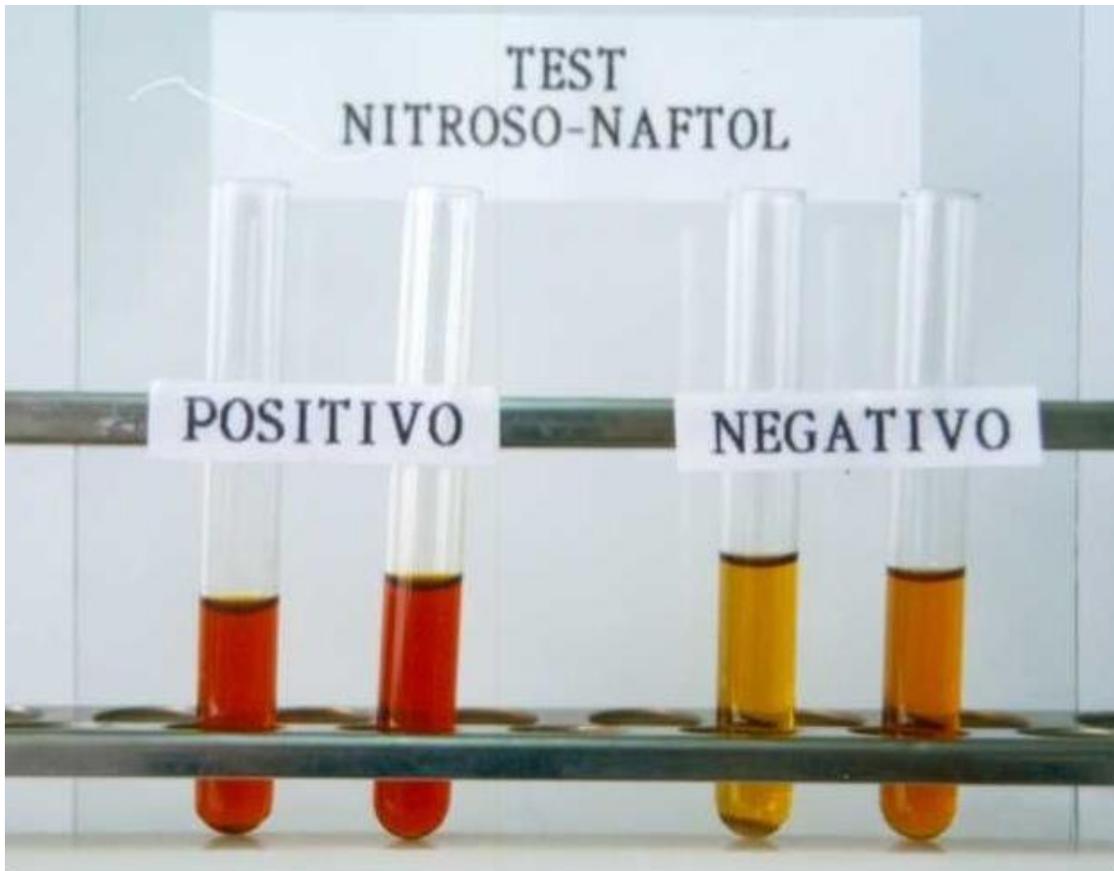
Las pruebas cualitativas son pruebas bioquímicas (pueden ser pruebas de tubo de ensayo rápidas y de fácil acceso (Regina et al., 2014)), que se realizan a partir de muestras de orina, por lo que se consideran apropiadas para tamizar muchas de las enfermedades consideradas EIM. La tabla 5.5 describe pruebas cualitativas de tubo de ensayo utilizadas como cribado en los EIM.

PRUEBA DE TUBO DE ENSAYO	Condición analizada	Sustrato analizado	Resultado positivo	Falsos positivos
Nitroso naftol	Hipertirosinemia	Tirosina, hidroximetilacetato y 4 hidroxifenil lactato	4 Color rojo Imagen 5.1	Tirosinemia transitoria del recién nacido, trastorno de mal absorción, metabolitos de la dopamina o la serotonina
Di-nitro-fenilhidralazina	Fenilcetonuria, Tirosinosis, síndrome Oasthouse, Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, la histidinemia y la tirosiluria	A-cetoácidos	Precipitados de color naranja-amarillo Imagen 5.2	Algunos antibióticos, contrastes radiopacos, hiperglicemia, academia isovalérica, enfermedades del almacenamiento del glucógeno
Nitroprusiato	Cistinuria (cisteinuria)	Cisteína homocisteína	– Rojo purpura Imagen 5.3	Muestras con presencia de ácidos.

				La detección de n-acetilcisteína, 2-homocisteína mercaptoetanol se realiza con la adición de metabolitos de la penicilina y el nitrato de plata produciendo un acetoacetato color magenta
Cloruro férrico	fenilcetonuria	Ácido fenilpirúvico	Coloración verde	Alcaptonuria, histidinemia y metabolitos de la clorpromazina
Prueba de Benedict	Síndrome de Fanconi, Fructosemia, galactosemia, alcaptonuria, hiperoxaluria, pentosuria	de Azúcares reductores Glucosa, galactosa, xilosa, fructosa, ácido oxálico, ácido homogentísico	Coloración verde esmeralda	Imagen 5.5
Prueba de Seliwanoff	fructosuria	cetosas	Coloración roja – naranja	sacarosas
Berry spot test	Mucopolisacaridosis	Glicosaminoglicanos	Coloración purpura	

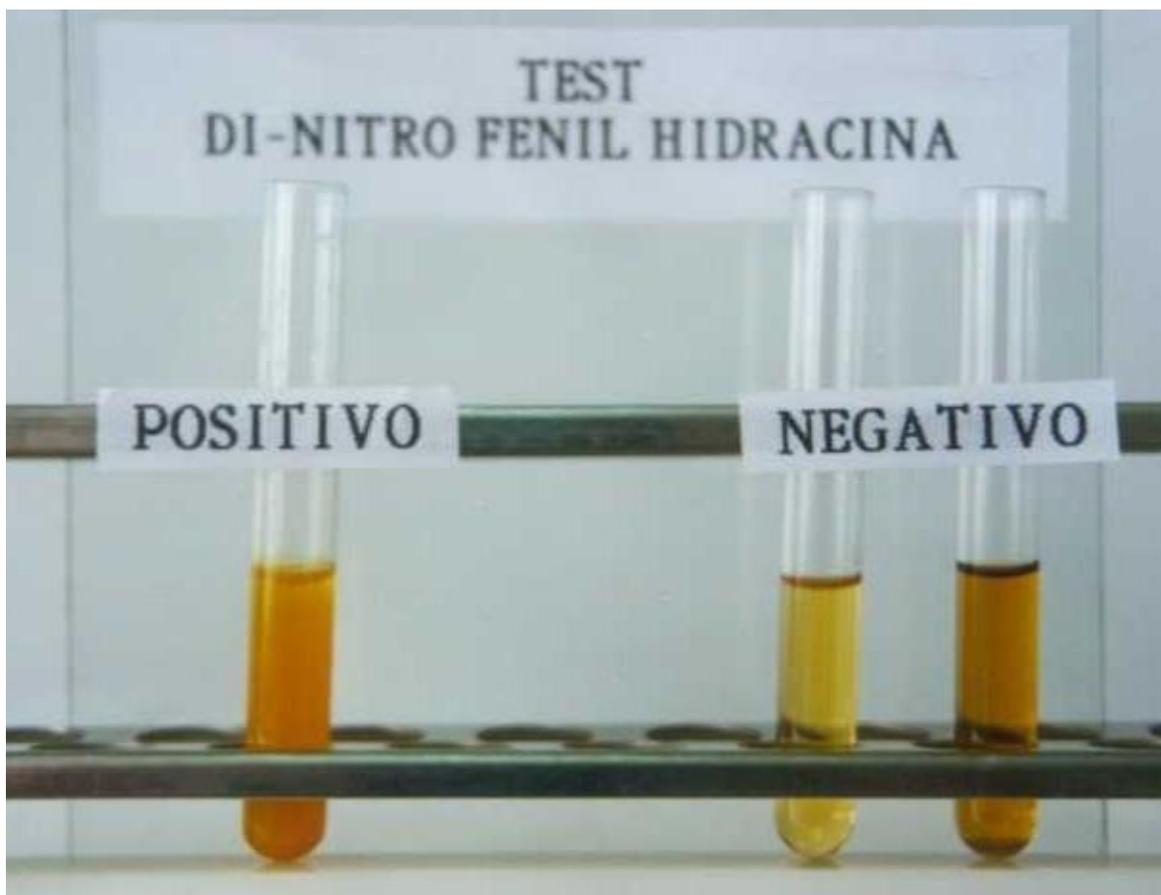
Tabla 5.5. Prueba de tubo para el cribado de algunos errores innatos del metabolismo modificado de (Chih-Kuang, Shuan-Pei, Shyue-Jye, & Tuen-Jen, 2002).

Imagen 5.1. Resultados prueba de tubo de ensayo con nitroso naftol para el cribado de hipertirosinemia



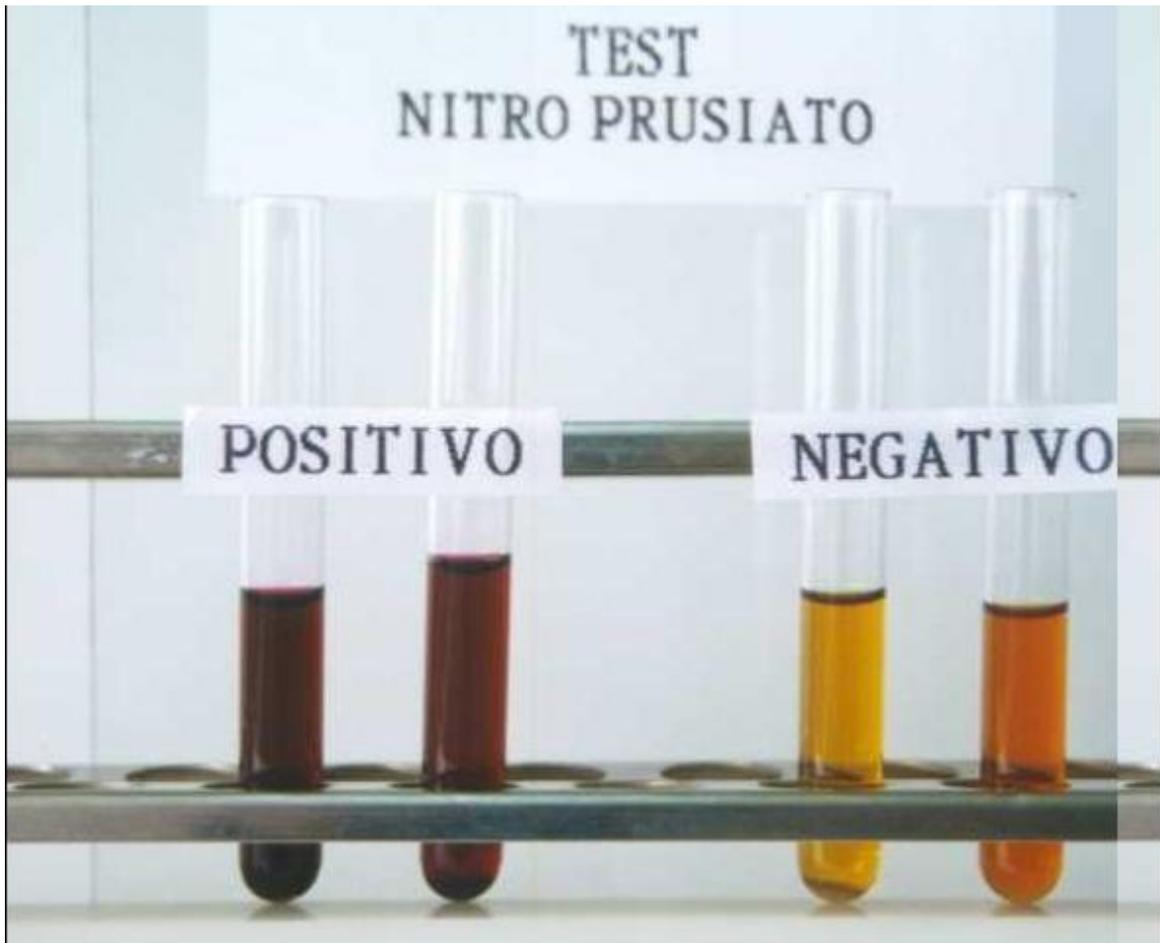
Archivo: Manual de Procedimientos, Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes, 2001. Cortesía: Alfredo Uribe Ph.D, Director

Imagen 5.2. Resultados prueba de tubo de ensayo con di-nitro-fenilhidralazina para el cribado de fenilcetonuria, Tirosinosis, Síndrome Oasthouse, Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, histidinemia y tirosiluria



Archivo: Manual de Procedimientos, Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes, 2001. Cortesía: Alfredo Uribe Ph.D, Director

Imagen 5.3. Resultado prueba de tubo de ensayo con Nitro prusiato para el cribado de cistinuria



Archivo: Manual de Procedimientos, Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes, 2001. Cortesía: Alfredo Uribe Ph.D, Director

Imagen 5.4. Resultado prueba de tubo de ensayo con Cloruro férrico para el cribado de fenilcetonuria



Archivo: Manual de Procedimientos, Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes, 2001. Cortesía: Alfredo Uribe Ph.D, Director

Imagen 5.5. Resultado prueba de tubo de ensayo con reactivo de Benedict para el cribado de Fructosemia, galactosemia, alcaptonuria, hiperoxaluria, pentosuria, Síndrome de Fanconi.



Archivo: Manual de Procedimientos, Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes, 2001. Cortesía: Alfredo Uribe Ph.D, Director

Imagen 5.6. Resultado prueba de tubo de ensayo con el reactivo Seliwanoff para el cribado de fructosuria



Archivo: Manual de Procedimientos, Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes, 2001. Cortesía: Alfredo Uribe Ph.D, Director

Adicionalmente, en el caso de las mucopolisacaridosis se encuentra también disponible otra prueba de cribado en orina a través del azul di-metil metileno, el cual muestra una sensibilidad de 100% y una especificidad entre el 97 – 99% (Gray, Claridge, Jenkinson, & Green, 2007), con una tasa de falsos positivos, de alrededor del 2.54% (Aranzadi, Miramar, Cesar, & Escanero, 2006). Es importante mencionar que para garantizar un adecuado resultado en el cribado, se debe contar con niveles de creatinuria superiores a 200 mg/L, debido a que valores inferiores a éste aumentan la frecuencia de falsos negativos (España, Benavidez, & Uribe, 2010).

Las pruebas cuantitativas son más exactas pero se acompañan de mayor costo e implican más requerimientos técnicos, por lo cual la aplicación como método de cribado es limitada. Dentro del enfoque cuantitativo se dispone de pruebas como la cromatografía líquida de alta resolución (Malviya, Bansal, Pal, & Sharma, 2009), la espectrometría de masas en tándem (Clarke, 2002) y la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (Stashenko & Martínez, 2010).

En la actualidad se está utilizando la espectrometría de masas (MS) como método de cribado para los errores innatos del metabolismo (Almannai, Marom, & Sutton, 2016), a continuación se lista un número de entidades que se pueden identificar a través de esta metodología.

Grupo	Error del metabolismo
Defectos de los Aminoácidos	Argininemia
	Acidemia argino-succinica
	Defectos de la biosíntesis del cofactor biopterina
	Citrulinemia
	Citrulinemia tipo II
	Homocistinuria cistationina beta-sintasa
	Hipermetioninemia
	Orina con olor a jarabe de arce
	Fenilcetonuria
	Tirosinemia tipo I – II – III

Deficiencia de la oxidación de los ácidos grasos	Deficiencia de la acil-carnitina translocasa
	Deficiencia de la carnitina palmitoiltransferasa I – II
	Deficiencia de la captación de carnitina
	Deficiencia de la dienoil-CoA reductasa
	Academia glutárica tipo II
	Deficiencia de 3 OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
	Deficiencia de la acil- CoA deshidrogenasa de cadena media
	Deficiencia de 3 OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena media/corta
	Deficiencia de la ceto-acil-CoA tiolasa de cadena media
	Deficiencia de la acil-CoA de hidrogenasa de cadena corta
	Deficiencia de la proteína trifuncional
	Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga
Acidurias orgánicas	Deficiencia de la 2 metilbutiril-CoA deshidrogenasa
	Aciduria 2-metil-3-hidroxitiruca
	Aciduria 3-metil-3-hidroxitiruca
	Aciduria 3-metilglucaconica
	Academia isovalérica
	Academia malónica
	Academia metilmalónica
	Deficiencia de la holocarboxilasa sintetasa
	Academia propiónica

Tabla 5.6. EIM cribados a través de espectrometría de masas

Aunque no todos los tipos de EIM tienen un método de cribado, muchos de los EIM tienen también pruebas diagnósticas directas, en este capítulo se hará referencia solo a las pruebas de cribado de EIM.

5.5.2 Cribado de defectos endocrinológicos

Algunos de los defectos endocrinológicos que tienen una causa genética son la hiperplasia adrenal congénita, el hipotiroidismo congénito, los desórdenes gonadales, las enfermedades hipotalámicas y pituitarias, los desórdenes tiroideos y las endocrinopatías múltiples (Forlenza et al., 2015); de todos ellos la hiperplasia adrenal congénita y el hipotiroidismo congénito son de los padecimientos relativamente comunes que pueden ser sujetos a cribado.

La hiperplasia adrenal congénita (HAC) es un grupo heterogéneo de desórdenes hereditarios que afectan la producción de las hormonas esteroideas adrenales y exhibe un patrón de herencia autosómico recesivo; de estos, la deficiencia de 21 hidroxilasa (21-OHD) es el más común, representado entre el 90-95% del total de casos (Al-Agha, Ocheltree, & Al-Tamimi, 2012). Clínicamente la 21-OHD se divide en tres formas: 1. Forma perdedora de sal, 2. Forma virilizante simple y 3. Forma no clásica. La forma perdedora de sal es la más común y severa y abarca entre el 70–80 % de todos los casos de 21-OHD (Speiser et al., 2010).

El método de cribado para la deficiencia de 21 hidroxilasa, consiste en la determinación de los niveles séricos de 17 hidroxiprogestero (Grosse & Van Vliet, 2007), determinación que tiene una sensibilidad de 98.5% y una especificidad de 99% (M. Pearce et al., 2016); este método de cribado tiene un valor predictivo positivo de 5.8%, así como la presencia frecuente de falsos positivos de 2.6%, principalmente en neonatos pre-término por su relación con la exposición a corticoides diferentes a la 17 hidroxiprogestero. Por otra parte, la proporción de casos en los cuales el cribado contribuye al diagnóstico es incierto y no existe consenso sobre el umbral para la 17 hidroxiprogestero, debido a cambios fisiológicos de están relacionados con la edad gestacional (Coulm et al., 2012).

Debido a estas dificultades presentadas por el método clásico, se ha propuesto complementarlo con la aplicación de un nuevo método que consiste en el análisis simultáneo de la 17 hidroxiprogesterona, androstendiona, 21-deoxicortisol, 11-deoxicortisol y cortisol, a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Dado que implica un conjunto de pruebas realizada en dos pasos, esta forma de cribado es denominada cribado en dos niveles (Sarafoglou et al., 2012), esta forma de cribado modifica los resultados de falsos positivos a un 0.09%; de la misma forma el valor predictivo positivo pasó a elevarse hasta el 9.4%, lo cual evidencia la utilidad, particularmente en recién nacidos prematuros, sin embargo el requerimiento de equipos altamente sensibles y personal especializado limitan la utilidad de este método para que sea aplicado de forma masiva (Tajima & Fukushi, 2016).

El hipotiroidismo congénito es una de las causas más frecuentes de discapacidad intelectual y retardo en el desarrollo de origen congénito; se presenta en 1 de cada 3.000 recién nacidos vivos (Büyükgözü, 2013), la posibilidad de intervenir efectivamente el curso natural de la enfermedad y modificar el pronóstico, permitió que hacia 1972 se introdujera el primer método de cribado para hipotiroidismo congénito (J H Dussault & Laberge, 1973). Basado en pruebas de radioinmunoensayo, éste método evalúa la competencia que hay entre una hormona problema y una cantidad conocida de la misma hormona marcada radioactivamente, para unirse a un anticuerpo específico; el resultado se obtiene midiendo la radioactividad presente en los anticuerpos, a mayor radioactividad, hay menor cantidad de sustancia problema unida a los anticuerpos y viceversa, luego de establecer los niveles de radioactividad se realiza una curva a partir de la cual se establece la concentración de la hormona problema (Praither, 1985).

Inicialmente se propuso para medir los niveles de T_4 , a partir de una gota de sangre en papel filtro, sin embargo era menos específico en casos de hipo- T_4 -globulinemia, hipotiroidismo secundario y síndrome de bajos niveles de T_4 en prematuros (Jean H Dussault, 2014), por lo cual en Europa se

consideró medir los niveles de la hormona estimulante de la tiroides –TSH- (Illig, Torresani, & Sobradillo, 1977), siendo esta más sensible para la detección de hipotiroidismo, mientras que en Norteamérica se continuaron midiendo los niveles de T₄ (Fisher et al., 1979)

En la actualidad se cuenta con protocolos que tienen a la TSH como único marcador; otros protocolos que utilizan la determinación de T₄ seguido de TSH, otros utilizan primero medir la TSH y luego determinan T₄ y otros que analizan los dos marcadores al tiempo (Pass & Neto, 2009).

En Colombia el marcador utilizado para realizar el cribado de hipotiroidismo congénito es la TSH, este biomarcador se analiza a través de métodos como el inmunofluorométrico, que muestra una sensibilidad de 97.5% y una especificidad de 99% (Büyükgemiz, 2013) y la prueba de ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, con una sensibilidad del 100% para detección de TSH (<http://www.ins.gov.co/>).

El formulario es un documento de papel con un título que dice "TAMIZAJE NEONATAL PARA HIPOTIROIDISMO CONGENITO" y el número "175821" en rojo. A la izquierda hay tres círculos para muestras de sangre. El formulario está dividido en secciones:

- DATOS DE LA MADRE:** Incluye campos para Institución, Ciudad, Municipio o Corregimiento, Dpto., EPS-S, EPS-C, No asegurado, Hijo de, Edad, Identificación (C.C., T.I., Otro), Número, Dirección, y Teléfono.
- DATOS DEL RECIEN NACIDO:** Incluye campos para Fecha de Nacimiento (DD, MM, AA), Hora, Sexo (F, M), Peso (grs.), Talla (cms), Edad de Gestación (Semanas), Parto múltiple (Sí, No), Transfundido (Sí, No), Muestra de Cordón, y Muestra de Talón.
- En la parte inferior izquierda, hay un campo para la Fecha de recolección de la muestra (DD, MM, AA).

En la parte superior izquierda del formulario, se lee "FT2-460 LOTE No. X12311 STORE AT: 15-25°C". En la parte inferior izquierda, se lee "Ministerio de Salud (E.S.) No. 7020006". En la parte inferior derecha, se lee "Tomado por:".

Imagen 5.7. Tarjeta FTA para cribado de hipotiroidismo congénito, por medio del método DBS – *dried blood spot*- mancha de sangre seca; el instituto nacional de salud recomienda que dicha muestra se tomada directamente del cordón umbilical o por medio de punción en el talón del recién nacido.

5.5.3 Cribado de alteraciones anatómicas fetales

La ultrasonografía se ha convertido en una de las principales herramientas para la evaluación de las características anatómicas fetales durante la vida intrauterina y el uso clínico data desde la década de 1950s (Donald, Macvicar, & Brown, 1958). A partir de la década de 1960s, se introdujo en la evaluación ginecológica (DONALD, 1962), para la localización de la placenta (Gottesfeld, Thompson, Holmes, & Taylor, 1966) y posteriormente, en la evaluación de características anatómicas fetales como por ejemplo el diámetro cefálico fetal (Campbell, 1969). La evaluación fetal también permitió identificar alteraciones como los como defectos del tubo neural y alteraciones en las extremidades (Hobbins, Grannum, Berkowitz, Silverman, & Mahoney, 1979).

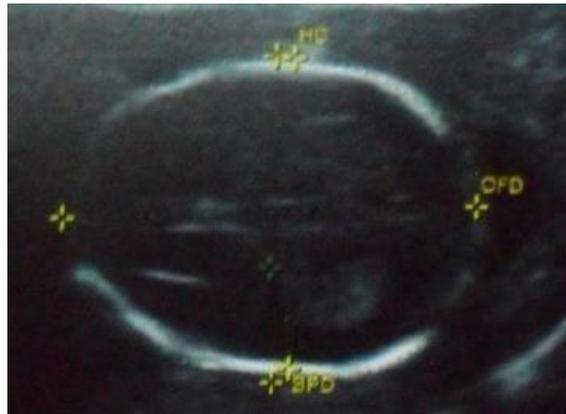


Imagen 5.8. Evaluación del diámetro cefálico como marcador de crecimiento fetal.

A partir de la década de 1980s, se implementó como método de pesquisa para anomalías fetales la ultrasonografía en la semana 20 de gestación (Campbell, 2013); encontrando que la ultrasonografía en dos dimensiones tiene una sensibilidad que depende del sistema comprometido, siendo entre el 70% - 90% para malformaciones del sistema nervioso central, entre el 40% - 50% para patologías

coronarias, entre el 46% – 100% para anomalías gastrointestinales y entre 16% - 45% para cromosomopatías, así mismo se puede encontrar una especificidad cercana al 100% para la identificación de anomalías fetales antes de las 24 semanas de gestación (Carrera, Torrents, Mortera, Cusí, & Muñoz, 1995; Renna et al., 2013). Por otro lado, la ultrasonografía en 2 dimensiones (2D) presentaba limitaciones para el análisis y para la manipulación posterior de las imágenes (diferentes vistas), lo que dio campo a la implementación de la ultrasonografía en tercera y cuarta dimensión.

La incorporación de la ultrasonografía en 3 y 4 dimensiones (3D y 4D), ha permitido evaluar características fetales más superficiales (Campbell, 2013), de ésta forma se ha logrado la identificación de hasta el 100% de los afectados con fisura de labio, entre el 86–90% de los afectados con fisura de labio y el paladar (Bäumler et al., 2011). De la misma forma, es posible identificar otras alteraciones de línea media como defectos neurológicos, siendo posible reconocer hasta el 80% de los defectos del tubo neural, >90% de las anencefalias y hasta el 80% de los afectados con encefalocele (Cameron & Moran, 2009).



Imagen 5.9. Ultrasonografía en tercera dimensión, gestación de 24 semanas.

Adicionalmente, mediante el ultrasonido es posible la identificación de displasias esqueléticas en el 77% de los casos y también ha permitido el reconocimiento de marcadores de tejidos blandos o “*soft markers*”, como indicadores de presencia de alteraciones cromosómicas, relacionadas con aneuploidías (Ali, Shazly, Ali, Abdelbadee, & Abbas, 2012), los cuales se relacionan en la tabla 5.7.

Órgano o sistema	Trisomía 21 (Síndrome Down)	Trisomía 18 (Síndrome Edwards)	Trisomía 13 (Síndrome Patau)
Cardíaco	Defectos septales	Defectos septales, síndrome de corazón izquierdo hipoplásico	Defectos septales, síndrome de corazón izquierdo hipoplásico, doble salida del ventrículo derecho
Neurológico	Ventriculomegalia, quiste de plexo coroideo	Ventriculomegalia, quiste de plexo coroideo (50%), malformación de Dandy-	Microcefalia, holoprosencefalia

		Walker, defectos del tubo neural	
Gastrointestinal	Intestino hiper-ecoico (3.3-27%), atresia duodenal, atresia esofágica	Onfalocele, hernia diafragmática, traqueo-esofágica, atresia duodenal, intestino hiper-ecoico	Onfalocele, fistula, atresia
Genito/urinario	Pielectasia (17-25%)	Pielectasia	Riñones poliquísticos
Cara	Hipoplasia o ausencia del hueso nasal (97%)	Micrognatia, fisura de labio/paladar (65.2%)	Fisura de labio/paladar
Osteomuscular	Acortamiento de humero y/o fémur (50-54%), clinodactilia	Manos empuñadas, dedos superpuestos, displasia del radio, anomalías de los pies	Polidactilia post-axial
Otros	Pliegue nucal engrosado >6mm (83%), restricción del crecimiento intrauterino	Pliegue nucal engrosado, restricción del crecimiento intrauterino, arteria umbilical única	Pliegue nucal engrosado, restricción del crecimiento intrauterino

Tabla 5.7. Marcadores de tejidos blandos *soft markers*. El número en paréntesis indica la proporción de aparición del rasgo en la imagen ultrasonográfica de acuerdo con cada patología. Tomado de (Conner, Longman, & Cahill, 2014).

La ultrasonografía obstétrica tiene alto valor para la detección de diferentes anomalías fetales, sin embargo, cuando ésta se realiza en el segundo trimestre entre las semanas 20-22, provee mayor precisión para la identificación de éstas alteraciones (Conner et al., 2014).

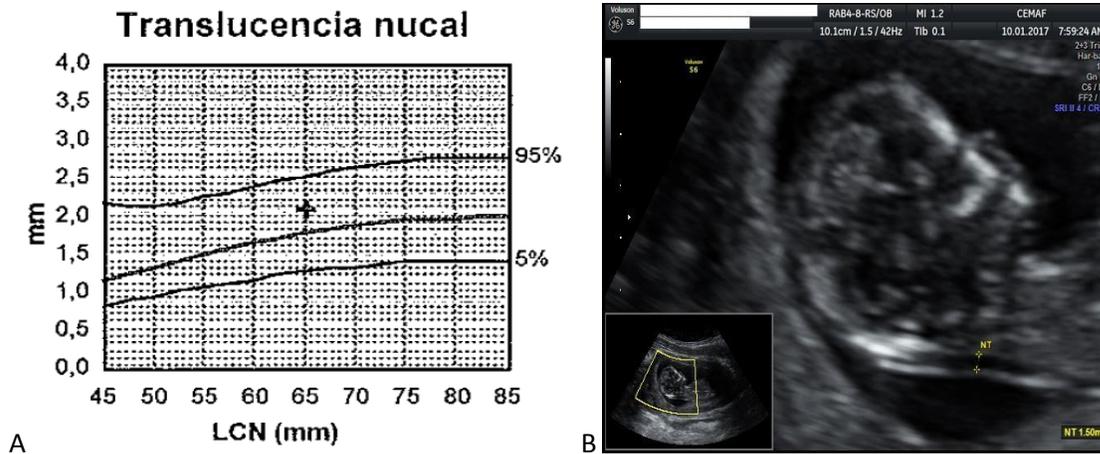


Imagen 5.10. Translucencia nucal. **A.** Curva de translucencia nucal reportada en la prueba de cribado en el primer trimestre realizado en un feto de 12 semanas + 6 días, **B.** Medición de la translucencia nucal durante la exploración ultrasonográfica. Cortesía de la doctora Andrea Peña, CEMAF, Ibagué, Colombia.

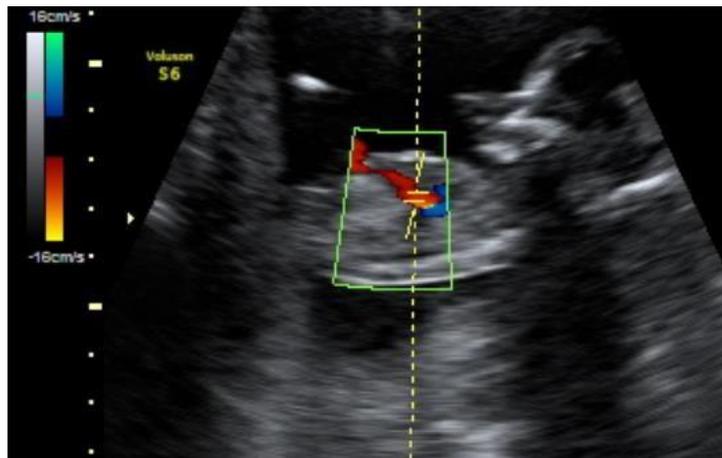


Imagen 5.11. Evaluación por ultrasonografía del Ductus arterioso, cortesía de la doctora Andrea Peña, CEMAF, Ibagué, Colombia.



Imagen 5.12. Evaluación simultanea de la osificación del hueso nasal y la translucencia nucz, como marcadores para el cribado de aneuploidías, cortesía de la doctora Andrea Peña, CEMAF, Ibagué, Colombia.

5.5.3.1 Ultrasonido y marcadores bioquímicos del primer trimestre y segundo trimestre

De otro lado, la ultrasonografía durante el primer trimestre puede ser complementada con el análisis de marcadores bioquímicos, los cuales pueden orientar de forma temprana sobre el riesgo de una gestación en presencia de aneuploidía (Spencer, Cowans, Molina, Kagan, & Nicolaidis, 2008).

Desde 1990 se propuso el análisis de marcadores bioquímicos como método de identificación de trisomías fetales, siendo el primero de ellos la β -hCG, que es la fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica, la cual mostraba un valor medio superior en la trisomía 21 de 2.15 MoM (*Multiple of Median*), un valor bajo en la trisomía 13 de 0.50MoM y en la trisomía 18 de 0.28 MoM (Shiefa, Amargandhi, Bhupendra, Moulali, & Kristine, 2013) y mostrando una tasa de detección que oscila entre el 71- 77%; posteriormente se encontró que la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) se encontraba en niveles bajos (\leq percentil 5) en aneuploidías fetales (Wald et

al., 1992), siendo los niveles de PAPP-A para trisomía 21 de 0.15 MoM, para la trisomía 13 de 0.25 MoM y para la trisomía 18 de 0.18; el uso de estos dos biomarcadores permite una tasa de detección superior al 90% (Shiefa et al., 2013).

Adicionalmente se incluyeron otros marcadores como la inhibina A, la α -feto proteína y el estriol (E3), cuyas tasas de detección son bajas, en algunos casos no mayores del 20% cuando se aplican de forma individual, sin embargo cuando estos biomarcadores son usados como cribado junto a otros marcadores como por ejemplo la edad materna, logran una tasa de detección mayor del 90% para la detección de aneuploidías (Dey, Sharma, & Aggarwal, 2013). A continuación se indica la tasa de detección de aneuploidías a partir del uso de marcadores bioquímicos asociados a edad materna y ultrasonografía.

Edad gestacional	Marcadores	Tasa de detección
Primer trimestre	Edad materna (EM), PAPP-A y β -hCG	60 – 63%
	Cribado combinado (US, EM, PAPP-A y β -hCG)	86-90%
	Cribado combinado + hueso nasal, flujo tricuspídeo, ducto venoso y ángulo facial	95%
Segundo trimestre	Prueba doble (EM, α -feto proteína y β -hCG)	60%
	Prueba triple (EM, α -feto proteína, E3 y β -hCG)	68%
	Prueba cuádruple (EM, α -feto proteína, E3, Inhibina A y β -hCG)	79%

Tabla 5.8. Tasa de detección de aneuploidías basados en edad materna, marcadores bioquímicos y ultrasonografía. EM: Edad Materna. PAPP-A: Proteína A Plasmática Asociada al Embarazo. US: Ultrasonografía. E3: estriol. Adaptado de (Dey et al., 2013)

Bioquímica de suero materno:

Muestra 1612124, tomada el: 26 de diciembre de 2016, Fecha del análisis: 30 de diciembre de 2016, Equipo: Delfia Xpress.

Beta hCG libre	34,7 UI/l	equivalente a 0,980 múltiplos de la mediana (MoM)
PAPP-A	3,139 UI/l	equivalente a 1,006 múltiplos de la mediana (MoM)

Imagen 5.13. Reporte del resultado del análisis de 2 marcadores bioquímicos β HCG y PAPP-A en una prueba de cribado en el primer trimestre para cromosopatías. Cortesía de la doctora Andrea Peña, CEMAF, Ibagué, Colombia.

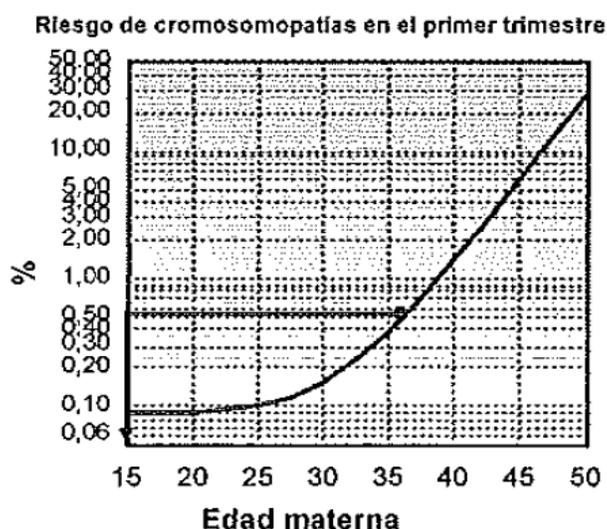


Imagen 5.14. Curva para calcular el riesgo de cromosopatías en el 1er trimestre de gestación, de acuerdo con la edad materna, cortesía de la doctora Andrea Peña, CEMAF, Ibagué, Colombia.

5.5.3.2 Pruebas Prenatales No Invasivas NIPT (*Non-Invasive Prenatal Testing*).

El diagnóstico fetal no invasivo o las pruebas prenatales no invasivas (NIPT), son un grupo de pruebas que evalúan el estado cromosómico a partir de material de origen fetal (células o ADN fetal libre) que pueda estar presente en una muestra obtenida del suero o de la sangre materna (Yagel, 2013).

El método parte del hecho que aproximadamente el 6% del ADN total circulante en sangre materna, corresponde a ADN de origen fetal (D. Lo, Tein, Lau, & Haines, 1998).

La presencia de células fetales en la sangre materna susceptibles de proporcionar información sobre las características cromosómicas de los fetos, fue documentada hacia finales de la década de 1960s (Walknowska, Conte, & Grumbach, 1969). Estudios posteriores demostraron la posibilidad de cuantificar efectivamente la cantidad de ADN fetal presente en la circulación materna (Y. M. D. Lo et al., 1997); de esta forma se pensó en la aplicación amplia del análisis del ADN fetal para la identificación del factor *Rh* de los fetos, así como la determinación del sexo fetal (Y. M. Lo et al., 1998; Sedrak, Hashad, Adel, Azzam, & Elbeltagy, 2011).

La placenta permite el paso bidireccional de células entre el feto y la madre, de esta forma es posible encontrar diferentes tipos de células fetales en el torrente sanguíneo materno (Y. M. Lo et al., 1996), desde la década de 1950s fue posible la identificación de células fetales como los eritroblastos (Weiner, Child, Garvie, & PEEK, 1958), los leucocitos (Desai & Creger, 1963) y el trofoblasto (Alberry et al., 2007); además, también es posible encontrar ADN (Y. M. D. Lo et al., 1997) y ARN libres (Poon, Leung, Lau, & Lo, 2000).

El ADN fetal puede ser obtenido de las células fetales presentes en la circulación materna, a partir de uno de varios métodos de selección de las células; de estos, los más utilizados son los que enriquecen la selección de los eritroblastos y se basan en:

- Ficoll o Percoll: es una técnica de separación celular por gradiente, la cual se logra, mediante la mezcla y centrifugación de la muestra con una cantidad específica de la solución FICOLL-HYPAQUE, obtener capas que contienen los diferentes componentes celulares, de las que se pueden aislar las células de interés (Corredor, 1994).

- FACS (*fluorescence-activated cell sorting*): es un método que utiliza el principio de la citometría de flujo. En él las células de interés son depositadas en una solución para ser marcadas con un fluorocromo y luego hacerlas pasar a través de un capilar el cual separa en cada gota una sola célula, la gota es censada por un dispositivo láser que, cuando detecta fluorescencia, activa un campo eléctrico que atrae a la célula de interés para que esta caiga en un recipiente, potenciando la proporción de células de interés (Herzenberg et al., 2002).
- MACS (*magnetic-activated cell sorting*): son partículas magnéticas formadas por óxido de hierro y polisacáridos con un diámetro aproximado de 50 nm., que se encuentran unidas a anticuerpos específicos para antígenos propios de la célula de interés; el proceso de separación se realiza pasando la muestra por una columna, la cual contiene una matriz con esferas magnéticas y anticuerpos que se unen a las células específicas para luego ser atraídas por un imán (Makker, Agarwal, & Sharma, 2008).
- Método de aglutinación basado en lectinas: en este método se aprovecha el poder de aglutinación que tiene la lectina derivada de soya, que se une a los glico-conjugados (glicoproteínas y glucolípidos que contienen galactosa), que están localizados en la superficie de los eritroblastos, esto permite al tiempo selección y recuperación celular (Van Driessche, De Cupere, Cruz, Machado, & Beeckmans, 2000)

Por otra parte, el ADN y ARN fetal circulante en la sangre materna provienen del trofoblasto (Alberry et al., 2007) y consiste de fragmentos cortos (de aproximadamente 150–200 bp) que se originan durante el proceso de apoptosis de estas células (Cecilia Lai-wan, Eric, & Celia Hoi-yan, 2006; Vaiopoulos, Athanasoula, Papantoniou, & Kolialexi, 2013). No obstante, en el caso del ADN fetal libre, se debe realizar igualmente un proceso de enriquecimiento. Dado que la cantidad de ADN fetal corresponde del 3 – 6% del total de ADN libre en circulación materna (Vaiopoulos et al., 2013), se requiere del uso de métodos de detección como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR con

sus variaciones tales como qf-PCR, RT-PCR y PCR digital entre otros), así como secuenciación masiva en paralelo y la espectrometría de masas en tándem (Ding et al., 2004) para mencionar algunos.

Para enriquecer el ADN libre fetal se ha utilizado la reducción de la presencia de ADN materno usando formaldehído, que estabiliza las membranas de las células maternas presentes en la muestra dado que detiene la lisis celular y por consiguiente, limita la presencia de ADN de origen materno. Luego de centrifugaciones sucesivas, se separa el ADN fetal del botón celular que contiene la mayoría de células maternas (Dhallan, Au, Mattagajasingh, & al, 2004).

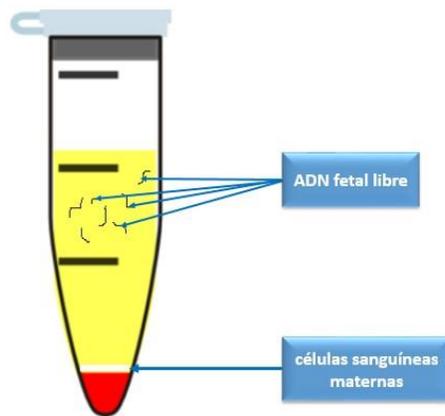


Figura 5.1. Método de enriquecimiento basado en formaldehído.

Un método alternativo para enriquecer el ADN fetal presente en sangre materna es la separación de fragmentos de acuerdo con el tamaño. En este proceso se parte de la extracción del ADN de la muestra por medio de centrifugación, seguida por separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa; luego se cortan manualmente las bandas del gel que tengan un tamaño aproximado entre 100 y 1.000 bp, para seguidamente extraerlas del gel mediante

procedimientos estandarizados, así se logra recuperar aproximadamente el 80% del ADN fetal presente en la muestra total (Ying Li et al., 2004).

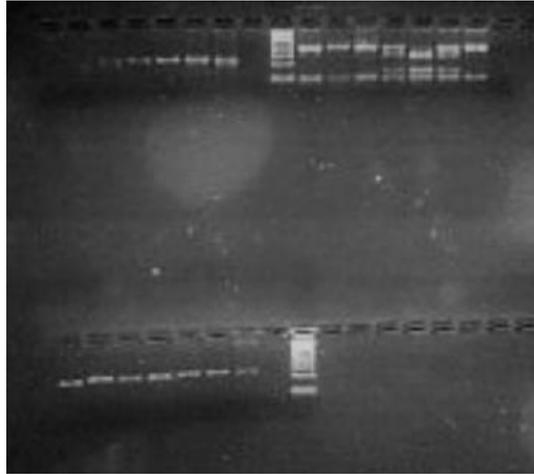


Imagen 5.15. Método de enriquecimiento del ADN por medio de separación de fragmentos por gradiente de peso.

Luego del proceso de enriquecimiento del ADN, se procede a identificar marcadores moleculares reconocibles tanto en fetos masculinos como en los femeninos (Wright & Burton, 2009) y que permitan confirmar y cuantificar el ADN de origen fetal.

Para realizar la prueba, se utilizan muestras de la madre que contiene ADN fetal y del padre; sobre ambas muestras se estudia una variedad de marcadores tales como los SNPs (Ying Li, Wenzel, Holzgreve, & Hahn, 2006), secuencias cortas repetidas en tándem (*STR*) (Pertl et al., 2000) y secuencias de ADN para identificar el sexo fetal (Wright, Wei, Higgins, & Sagoo, 2012). Algunos de estos marcadores permiten identificar la presencia efectiva de ADN fetal dentro de la sangre materna al compararse los alelos con aquellos de origen paterno (excluyendo los SNPs maternos).

Por otra parte, es posible que en futuro cercano se introduzcan al NIPT marcadores epigenéticos (Tsui, Chiu, & Lo, 2010) o de micro ARN (miRNA), como es el caso del miRNA-99a humano que se ha relacionado con cardiopatías congénitas (Kehler, Biro, Lazar, Rigo, & Nagy, 2015).

El uso de estos marcadores moleculares permite confirmar que el material genético analizado es de origen fetal, también permite identificar el número de copias presente para cada región lo cual a su vez permite reconocer eventuales aneuploidías fetales en los cromosomas que se incluyen en el análisis (generalmente los cromosomas 13, 18, 21, X y Y), algunas alteraciones monogénicas y además de identificar el sexo fetal, sea este masculino o femenino (Akolekar, Farkas, VanAgtmael, Bombard, & Nicolaides, 2010; Breveglieri et al., 2016),

Tipo de análisis	Marcador	Condición analizada
Determinación del sexo	<i>SRY</i>	Identificación de sexo masculino
	<i>DYS14</i>	Identificación de sexo masculino
	<i>DYS1</i>	Identificación de sexo masculino
	<i>DYZ1</i>	Identificación de sexo masculino
	<i>DYS3</i>	Identificación de sexo masculino
	<i>DAZ</i>	Azoospermia
	<i>ZFY</i>	Identificación de sexo masculino
	<i>AMEL</i>	Identificación de sexo masculino y femenino
Enfermedades hemolíticas del recién nacido	<i>RHD</i>	Identificación factor Rh
	<i>RHC</i>	Identificación de antígenos Rh C
	<i>RHc</i>	Identificación de antígenos Rh c
	<i>RHE</i>	Identificación de antígenos Rh E
	<i>KEL</i>	Identificación del grupo sanguíneo KELL
	<i>ABO</i>	Identificación del grupo sanguíneo ABO
	<i>HD</i>	Enfermedad de Huntington

Desordenes monogénicos	<i>FGFR3</i>	Acondroplasia
	<i>DMPK</i>	Distrofia miotónica
	<i>CFTR</i>	Fibrosis quística
	<i>DYT1</i>	Distonía primaria de inicio temprano
	<i>Globin</i>	B-talasemia
	<i>rs6528633</i>	Hemofilia
	<i>CYP21</i>	Hiperplasia adrenal congénita
ANEUPLOIDIAS	<i>SNPs</i> (Liao et al., 2012)	Trisomía 21
		Trisomía 18
		Trisomía 13

Tabla 5.9 Marcadores moleculares utilizados en NIPT Modificado de (Wright & Burton, 2009).

La NIPT puede alcanzar una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% (Zhou et al., 2014); para la trisomía 21 posee una sensibilidad de 99.2% y una especificidad de 99.95 %; para la trisomía 18 es de 96.3 % y 99.95% respectivamente y para la trisomía 13, la sensibilidad es del 91% y la especificidad del 99.96% (Gil, Akolekar, Quezada, Bregant, & Nicolaidis, 2014; H. Zhang et al., 2015). En los casos de aneuploidías para los cromosomas sexuales como 45,X y 47,XXY (Zimmermann et al., 2012), el análisis de NIPT es menos sensible y alcanza valores entre el 85.5 y el 97.8% (Gil et al., 2014). En lo referente a desórdenes monogénicos (Bustamante-Aragonés et al., 2012; Saito, Sekizawa, Morimoto, Suzuki, & Yanaihara, 2000), y la clasificación *Rh*, la sensibilidad oscila entre el 96 al 100% (Chitty et al., 2014).

Al ser posible la obtención de ADN fetal se hace viable detectar un número amplio de otras alteraciones genéticas, principalmente de tipo monogénico, a través de la utilización de pruebas como:

- Secuenciación de siguiente generación (NGS) o secuenciación masiva en paralelo, la cual amplifica de manera masiva fragmentos de ADN entre 200–600 bp en un solo ensayo, seguido del re-ensamblaje continuo de las secuencias y el análisis bio-informático de las secuencias alineadas, las cuales se comparan a lo largo de todos cromosomas con la secuencia del genoma humano (Tucker, Marra, & Friedman, 2009)
- Inmunoprecipitación de ADN metilado: este método utiliza fragmentos de ADN entre 200 y 400 bp que son identificados y precipitados con la ayuda de un anticuerpo específico como el anti-5mC, el cual es afín por las regiones 5mC del ADN, o mediante perlas de sefarosa unidas a proteínas recombinantes que reconocen sitios de hipermetilación en las islas CpG (Shanmuganathan et al., 2013); luego, las regiones seleccionadas son analizadas por medio de PCR convencional o en tiempo real, para el caso un único gen o a través de micro-arreglos o de secuenciación de siguiente generación cuando el análisis se haga a escala genómica (Schilling & Rehli, 2007); de esta forma es posible establecer un perfil de metilación de una región genómica en estudio y reconocer alteraciones como hipermetilación en el caso de la leucemia (Gebhard et al., 2006), y otras patologías que puedan requerir bio-marcadores diagnósticos o de seguimiento (How, Myrtue, & Tost, 2012)
- PCR digital: es un método que permite la detección y cuantificación absoluta de ácidos nucleicos (Vogelstein & Kinzler, 1999). Este proceso se desarrolla en dos pasos: en el primer paso se produce la amplificación del material genético por medio de reacciones de PCR realizadas simultáneamente en varios platos individuales; en el segundo paso, el producto amplificado es hibridado con sondas fluorescentes que son detectadas en dos longitudes de onda distintas seguidas de análisis por medio de métodos estadísticos (como la distribución de Poisson). Este método permite amplificar, cuantificar y establecer la proporción de fragmentos que se encuentran en una menor cantidad en el material genético analizado

(comparando el ADN en estudio y el ADN silvestre) (Pohl & Shih, 2004). El método de PCR digital es útil para la detección y el seguimiento de células tumorales circulantes (Shoda et al., 2016), para la cuantificación absoluta de carga viral (K. Zhang, Lin, & Li, 2016) y en los casos de mutaciones raras (Belmonte et al., 2016).

En cualquiera de estos métodos los resultados producen una serie de datos crudos que deben ser analizados por medio de programas bioinformáticos, como por ejemplo “RAPIDR” (*Reliable Accurate Prenatal Non Invasive Diagnosis R package*) (Plagnol, 2014), o *NATUS algorithm* (Nicolaidis, Syngelaki, Gil, Quezada, & Zinevich, 2014), con el objetivo de identificar alteraciones genéticas en el feto y se pueda determinar conductas tendientes a mitigar las consecuencias nocivas que para él pueda tener.

En la actualidad existen varios estuches disponibles comercialmente, para la realización pruebas prenatales no invasivas, a continuación se mencionan los más conocidos

Nombre del estuche	Técnica de análisis	Objetivo (target)	Sensibilidad	Especificidad
HARMONY™	SMP	Aneuploidías en los cromosomas 21, 18, 13, X y Y	> 99 %	> 99 %
VERIFI™	SMP	Trisomías de los cromosomas 21, 18, 13 Monosomías del cromosoma X Determinación del genero	98.2 – 99.9	99.9 – 99.9
PANORAMA™	SNPs (19.488) que cubren los cromosomas 13, 21, 18, X y Y	Trisomías de los cromosomas 21, 18, 13 Trisomías de cromosomas sexuales Monosomías del cromosoma X Determinación del genero Síndromes de microdelección 22q11.2 1p36	>99%	>99%

		Síndrome <i>Cri-du-chat</i>		
		Síndrome Prader-Willi/Angelman		
MaterniT21	SMP por shotgun	Trisomías de los cromosomas 21, 18, 13, 16 y 22 Aneuploidías del cromosomas (X-Y) Monosomías del cromosoma X Determinación del género Síndromes de microdelección del22q11.2 xx11q Síndrome Jacobsen xx8q Síndrome Larger-Giedion del4p Síndrome Wolf-Hirschhorn xx1p36 del5p Síndrome <i>Cri-du-chat</i> del15q11 Síndrome Prader-Willi/Angelman	>99%	>99%
Tomorrow	NGS	Trisomias 13, 18 y 21, aneuploidias sexuales, determinación del sexo fetal; síndrome Prader-Will/Angelman del 15q11, síndrome di George del 22q11, síndrome Cri-du-chat del 5p, síndrome Wolf Hirschhorn del 4p y síndrome de la del 1p36	>99%	>99%

Tabla 5.10 Estuches comerciales para NIPT. SMP (Secuenciación Masiva en Paralelo). Modificado de (Kotsopoulou, Tsoplou, Mavrommatis, & Kroupis, 2015).

Con el avance y la optimización de las técnicas de procesamiento y análisis del ADN, se podrán ampliar aún más los blancos diagnósticos para el análisis de condiciones genéticas detectables en el periodo prenatal y el cual puede ser realizado con este tipo de pruebas, es de anotar que las pruebas no invasivas, no solo están limitadas al diagnóstico prenatal, también se están abriendo campo en

el diagnóstico oncológico (Fernandez-Mercado et al., 2015), es por ello que el futuro de este método de diagnóstico es bastante promisorio.

5.5.4 Cribado de sorderas

De todas las pérdidas auditivas, el 50% tiene un origen genético, las cuales se pueden clasificar como sindrómicas y no sindrómicas (Svidnicki et al., 2015); las formas sindrómicas se acompañan de otras características fenotípicas además de la menor audición y representan aproximadamente el 30% del total de hipoacusias (Resendes, Williamson, & Morton, 2001), la tabla 5.11 lista algunos de los síndromes que se presentan con pérdida auditiva.

Síndrome	Gen	HERENCIA	Prevalencia
Alport	<i>COL4A3, COL4A4, COL4A5</i>	Dominante Recesiva Ligado X	1-9/100.000
Braquio-oto-renal (BOR)	<i>EYA1</i>	Dominante	1/40.000
CHARGE	<i>SEMA3E, CHD7</i>	Dominante	Sin información
Jervell y Lange-Nielsen	<i>KCNQ1, KCNE1</i>	Recesiva	1-9/1.000.000
Neurofibromatosis 2	<i>NF2</i>	Dominante	1-9/100.000
Norrie	<i>NDP</i>	Ligado X	Sin información
Pendred	<i>SLC26A4</i>	Recesivo	1-9/100.000
Perrault	<i>HSD17B4</i>	Recesivo	<1/1.000.000
Stickler	<i>COL2A1, COL11A1, COL11A2, COL9A1</i>	Dominante Recesivo	1-9/1.000.000
Treacher-Collins	<i>TCOF1</i>	Dominante	1-9/100.000
Usher	<i>USH1, USH2, USH3</i>	Recesivo	1-9/100.000
Waardenburg	<i>PAX3, MITF X 3, SOX10</i>	Dominante Recesivo	1-9/100.000

Tabla 5.11. Síndromes genéticos que cursan con pérdida auditiva. Modificado de (Resendes et al., 2001) (<http://hereditaryhearingloss.org/>).

Por otro lado, las formas no sindrómicas son mayoritarias y abarcan el 70% de todos los afectados con sorderas de tipo genético y se pueden clasificar de acuerdo al patrón de herencia en: autosómicas dominantes (M B Petersen, 2002), autosómicas recesivas (Michael B. Petersen & Willems, 2006), ligadas a X (Bayazit & Yilmaz, 2006) y mitocondriales (Forli et al., 2007).

De las sorderas no sindrómicas, el 15 - 24% presentan herencia autosómica dominante y algunos de los genes involucrados se hallan identificados como *DFNA* (del inglés *DeaFNess* y A por autosómica dominante); el 75 -85 % tienen herencia autosómica recesiva y algunos de los *loci* genéticos se denominan *DFNB* (B autosómico recesivo); y menos de 1% de las hipoacusias no sindrómicas corresponden a herencia mitocondrial o ligada al X en esta última los genes se denominan *DFNX* (Egilmez & Kalcioglu, 2016).

Hasta la fecha se han informado aproximadamente 125 *loci* genéticos, distribuidos en 58 *loci* para sorderas con herencia dominante, 63 para sorderas autosómicas recesivas y 4 para sorderas de herencia ligada a X (<http://hereditaryhearingloss.org/>). Dentro de los genes más comunes como causa de pérdida auditiva aislada autosómica recesiva, se encuentran: *GJB2*, *GJB6*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23* y *TMC1*; mientras que para las pérdidas auditivas autosómicas dominantes los genes más frecuentes son *WFS1*, *KCNQ4*, *COCH* y nuevamente *GJB2* (Hilgert, Smith, & Van Camp, 2009).

La heterogeneidad genética hace difícil la aplicación, por ahora, de un método de cribado masivo basado en el estudio de ADN para identificar a personas con pérdida auditiva aislada o sindrómica. De hecho, métodos de pesquisa masivos no genéticos, se puede realizar en recién nacidos, en niños pre-escolares o en personas adultas que tienen exposición al ruido o para obtención de la licencia de conducción, con el objeto de identificar a las personas con pérdida auditiva por cualquier causa, sea genética o ambiental.

Actualmente *the Joint Committee on Infant Hearing*, propone dos enfoques para el cribado auditivo neonatal, estos son la emisión otoacústica y los Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Encefálico (PEAT), las cuales permiten la identificación de hipoacusias conductivas y sensoriales mayores a 40 dB (decibeles) (Norton et al., 2000), con lo que se logra la identificación de niños con pérdida auditiva moderada o severa.

La emisión otoacústica es un método que permite la evaluación objetiva de la actividad de las células ciliadas en el oído, por medio de estímulos auditivos a través de un clic o por medio de tonos en diferentes frecuencias, con lo que es posible la detección de anomalías auditivas en umbrales superiores a 20 dB y con frecuencias de entre 1.000 y 4.000 Hz; sin embargo, no es posible por este método evaluar el nervio auditivo (Alvo, Der, & Délano, 2010).

Por otro lado, los PEAT permiten la evaluación de toda la vía auditiva, incluyendo el nervio auditivo, al analizar 5 picos que se presentan luego de un estímulo sonoro, estos picos representan secciones de la vía auditiva de la siguiente manera: el pico I valora la porción distal del nervio auditivo; el pico II analiza la porción proximal del mismo nervio y el núcleo coclear ipsilateral; el pico III representa la señal que se produce desde el núcleo coclear al complejo olivar superior ipsilateral y de la vía trapezoide a las olivas superiores contralaterales y, finalmente, los picos IV/V representan el lemnisco lateral y el colículo contralateral inferior en el mesencéfalo (Walsh, Kane, & Butler, 2005).

A través de estos dos enfoques es posible cribar alteraciones auditivas en cualquier etapa de la vida, con una sensibilidad de 66.7% y una especificidad del 98.8% para la emisión otoacústica (Yousefi, Ajalloueyan, Amirsalari, & Fard, 2013) y una sensibilidad y especificidad de 100% para PEAT (Sena-Yoshinaga, Almeida, Côrtes-Andrade, & Lewis, 2014). Con esto, se ha propuesto realizar el cribado de los recién nacidos dentro del primer mes de nacimiento, con el propósito de detectar

alteraciones antes de los 3 meses, e iniciar una intervención antes de los 6 meses de vida (Norton et al., 2000).

5.5.5 Cribado de defectos oculares congénitos

Los primeros registros sobre tamizado visual son de finales del siglo XIX, cuando se incorporó la medida de la agudeza visual por medio de una escala de optotipos, método inventado por Kuechler en 1843; luego en 1862 Snellen introdujo un método estandarizado científicamente con el mismo propósito. Pasados unos años, la escala de optotipos ideada por Kuechler fue modificada por Ritter, Stellway y Samée, siendo aplicada hasta la actualidad de forma masiva como método de cribado para la agudeza visual y recibiendo el nombre de carta de Snellen (Austin, 1954).

Por otro lado en 1850 von Helmholtz presenta en la sociedad física de Berlín el *Augenspiegel* o espejo de ojo, instrumento que permitirá la visualización del fondo del ojo (J. M. S. Pearce, 2009), y que fue ampliamente utilizado en Europa con este propósito; posteriormente el oftalmólogo griego Anagnostakis sugirió el nombre de oftalmoscopio para el aparato inventado por Helmholtz, con el que es reconocido en la actualidad (Güemez-Sandoval, 2008).

Hasta la fecha los dos instrumentos continúan vigentes para el tamizado de alteraciones del ojo, no obstante, es el oftalmoscopio el que tiene una mayor aplicación cuando se trata de identificar patologías congénitas del ojo. A través de él se pueden identificar alteraciones en el cristalino, en la córnea y en la retina como: cataratas congénitas, retinosis pigmentaria o retinoblastoma, por mencionar algunas; es importante tener en cuenta que la presencia de alteraciones oculares congénitas puede ser la manifestación de una patología sistémica.

En la actualidad y de manera sistemática, luego de la inspección ocular externa del ojo y sus anexos, se realiza la evaluación del rojo retiniano y el fondo de ojo por medio del oftalmoscopio; este procedimiento permite la identificación de alteraciones oculares congénitas con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 38%, cuando es realizado sin dilatación pupilar (Mussavi, Asadollahi, Janbaz, Mansoori, & Abbasi, 2014), siendo considerado un método aceptable para identificar condiciones como las cataratas congénitas (Huo, Yang, & Zhang, 2014).

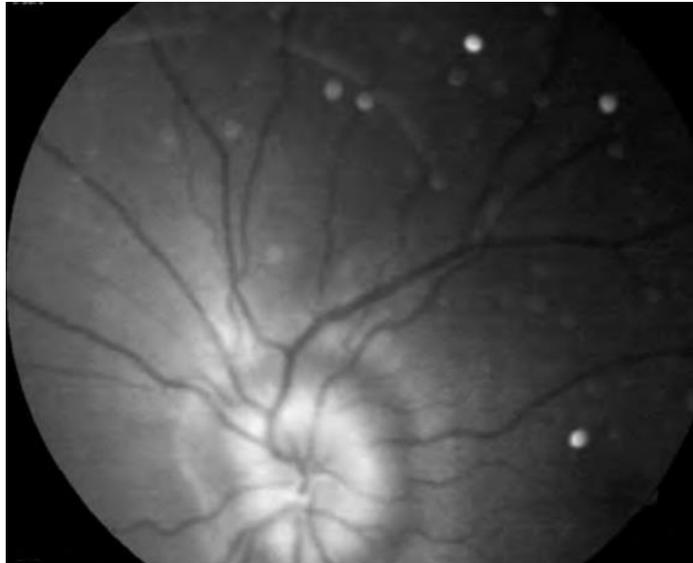


Imagen 5.16. Fondo de ojo que permite evidenciar edema del nervio óptico en un paciente con síndrome Hurler tomado de (Cardozo Sarubbi, López, & Manzitti, 2009). Imagen cedida gentilmente por el doctor Julio Manzitti, Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina.

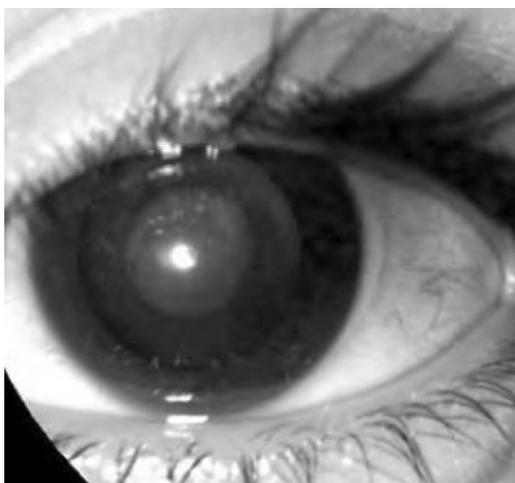


Imagen 5.17. Catarata en un paciente con galactosemia tomado de (Cardozo Sarubbi et al., 2009).
Imagen cedida gentilmente por el doctor Julio Manzitti, Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina.

Se ha propuesto la utilización de paneles genéticos como método para cribar defectos congénitos oculares, como la amaurosis congénita de Leber (Rezaie et al., 2007), la retinitis pigmentosa (van Huet et al., 2015) y la enfermedad de Stargardt (F. Jiang et al., 2016); sin embargo, la precisión y los costos de estos paneles no los hace por el momento una opción para cribado masivo.

5.5.6 Cribado de desórdenes hematológicos

Dentro de los desórdenes hematológicos de origen genético se encuentran las hemoglobinopatías, trombofilias, talasemias y hemofilias (DABIR, 2006). Las primeras pruebas de cribado para hemoglobinopatías se realizaron en los años 60s (Lerner, Platania, & LaBella, 2009); hacia mediados de la década de 1970, se estableció en los Estados Unidos un programa de cribado para la detección de anemia de células falciformes, a través de técnicas como electroforesis en gel, de enfoque

isoeléctrico (Kleman, Vichinsky, & Lubin, 1989), electroforesis alcalina (J. E. Kim et al., 2011) y cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) (Colah et al., 2007).

Los métodos más utilizados para la pesquisa de hemoglobinopatías son en primer lugar la electroforesis alcalina, que es conocida también como electroforesis en acetato de celulosa. En este método, la hemoglobina es aplicada sobre un gel de agar de acetato celulosa y es separada por medio de electroforesis en un medio alcalino, mediante un amortiguador compuesto por Tris-EDTA y ácido bórico a un pH de 8.4 (Hicks & Hughes, 1975); las bandas de cada tipo de hemoglobina son separadas y cuantificadas por medio de densitometría. A través de la electroforesis alcalina es posible observar e identificar las variantes de HbA, HbS, HbF y HbC, con una sensibilidad del 66% y especificidad del 100% (Khosa, Usman, Moinuddin, Mehmood, & Qamar, 2015).

En segundo lugar se encuentra la cromatografía líquida de alto desempeño, en ella la fracción de hemoglobina es puesta en un cartucho de intercambio de cationes y, usando un gradiente de tampón que incrementa la fuerza de atracción del cartucho, se logra la separación de las diferentes fracciones de la hemoglobina, las cuales son puestas en una fase de flujo proporcionado por una bomba de presión y analizadas a través de la cuantificación de absorbancia a 415 nm y, posteriormente a 650 nm (Ou & Rognerud, 2001). De esta forma se logra una adecuada identificación de los tipos de hemoglobina, así como la cuantificación de la misma, lo que permite el uso en el cribado de hemoglobinopatías con una sensibilidad y una especificidad mayor del 99% (Khosa et al., 2015).

5.5.6.1 Cribado de grupos sanguíneos

El grupo sanguíneo y el factor Rh, son dos características determinadas genéticamente, las cuales son heredadas de padres a hijos, fueron en algún momento de la historia utilizadas como

marcadores para la identificación y establecimiento de relación filial, esta propiedad está dada principalmente por antígenos presentes en los eritrocitos (Mitra, Mishra, & Rath, 2014); sin embargo, estos antígenos pueden generar una respuesta inmunológica de precipitación cuando son puestos en contacto con anticuerpos presentes en una persona receptora de esas células, como es el caso de una transfusión o cuando los eritrocitos fetales pasan al torrente sanguíneo de la madre (durante el embarazo), siendo este último caso, el de mayor relevancia para el cribado debido a las consecuencias catastróficas que pueden desencadenarse como la enfermedad hemolítica del recién nacido (Fuenzalida C & Carvajal C, 2014).

La isoimmunización eritrocitaria feto-materna ocurre hasta en el 13% de todos los embarazos (Bowman, 2006), y se caracteriza por la presencia de anticuerpos maternos contra el antígeno Rh fetal presente en los eritrocitos (Al-dughaihi et al., 2016), lo que ocasiona hemolisis de los glóbulos rojos fetales y, si alcanza niveles suficientes, daño encefálico por aumento de bilirrubinas, *hidrops fetal* y muerte intrauterina (Neil D Avent & Reid, 2000).

Por otro lado la incompatibilidad de grupo sanguíneo ABO es una condición que se presenta por la presencia de anticuerpos tipo IgG de la madre que tiene un grupo sanguíneo O, contra los antígenos del feto que puede ser del grupo A o del grupo B (Covas, María del C. et al., 2009). La condición patológica se presenta cuando los anticuerpos de la madre son capaces de cruzar la barrera placentaria y ponerse en contacto con los antígenos de las células rojas fetales, los cuales quedan sensibilizados y son reconocidos por los macrófagos que inician su destrucción, generando hemolisis que desencadena hiperbilirrubinemia, presentándose en aproximadamente el 2% de todos los nacimientos en el Reino Unido (Akanmu, Oyedeji, Adeyemo, & Ogbenna, 2015).

A partir de 1970 en los Estados Unidos se implementó la identificación del grupo sanguíneo ABO y el factor Rh de todas las gestantes, con el propósito de determinar cuales tenían riesgo de presentar

la enfermedad hemolítica del recién nacido (Dean, 2005); en Colombia, se encuentra establecido que a todas las gestantes en su primer control prenatal se les debe indicar la hemoclasificación; así mismo a través de la Norma Técnica para la Atención del Recién Nacido, se ha establecido que a todo neonato se le debe tomar muestra de sangre para realizar hemoclasificación (<https://www.minsalud.gov.co>).

Así mismo, a todos los neonatos de madres Rh negativas, se les realiza la prueba de Coombs directa o determinación de anti-globulina humana; esta prueba permite determinar la presencia de anticuerpos anti-eritrocitarios del isotipo IgG de origen materno en la superficie eritrocitaria (Baptista-gonzález et al., 2009); el 91% de los resultados positivos de esta prueba están relacionados con incompatibilidad ABO (Valsami et al., 2015).

5.5.7 Cribado en cáncer hereditario

Entre el 5% al 10% de todos los cánceres tienen un origen hereditario, es decir, el tumor es producto de una mutación que se ha segregado entre los miembros de una familia y los hace susceptibles de presentar una neoplasia (Nagy, Sweet, & Eng, 2004). Si bien es cierto la proporción de casos hereditarios es relativamente baja, la importancia de este tipo de cánceres es mayor, cuando es posible identificar a las personas que tienen el riesgo potencial de desarrollar algún tipo de cáncer y someterlas a un tratamiento precoz que disminuya o erradique el riesgo de muerte por esta causa (Trepanier et al., 2004). A continuación se listan algunos de los síndromes de cáncer hereditario.

Síndrome	Gen afectado	Herencia	prevalencia
Cáncer de mama/ovario hereditario	<i>BRCA1 – BRCA2</i>	Dominante	1-5/10.000

Cáncer colorrectal no polipósico hereditario (Lynch)	<i>MSH2, MSH6, MLH1, PMS2</i>	Dominante	Sin datos
Síndrome Cowden	<i>PTEN</i>	Dominante	1-9/1.000.000
Poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	Dominante Recesivo	1-9/100.000
Síndrome Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	Dominante	1-9/100.000
Síndrome Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	Dominante	1-9/1.000.000
Retinoblastoma hereditario	<i>RB1</i>	Dominante	1/15.000
Síndrome von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	Dominante	1/100.000
Neoplasia endocrina múltiple tipo I	<i>MEN1</i>	Dominante	1-9/100.000
Neoplasia endocrina múltiple tipo II	<i>RET</i>	Dominante	1-9/100.000
Tumor de Wilms	<i>WT1</i>	Dominante	1-9/100.000
Síndrome Muir-Torre	<i>MSH2, MLH1</i>	Dominante	Sin datos
Carcinoma gástrico difuso hereditario	<i>CDH1</i>	Dominante	Sin datos
Poliposis juvenil	<i>SMAD4, BMPR1A</i>	Dominante	<1/1.000.000
Adenoma de hipófisis aislado familiar	<i>AIP</i>	Dominante	Sin datos
Anemia de Fanconi	<i>FANCA, FANCB, FANCC, FANC, FANCD1, BRAC2, FANCAD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCI, FANCJ, FANL, FANCM, FANCN, PALB2</i>	Recesivo	1/360.000
Ataxia-telangiectasia	<i>ATM</i>	Recesivo	1/30.000- 1/100.000
Síndrome Birt-Hogg	<i>FLCN</i>	Dominante	Sin datos
Síndrome Bloom	<i>RECQL3</i>	Recesivo	Sin datos
Complejo de Carney	<i>PRKRA1A</i>	Dominante	Sin datos
Síndrome Costello	<i>HRAS</i>	Dominante	Sin datos

Esclerosis Tuberosa	<i>TSC1-TSC2</i>	Dominante	1/6.000-1/10.000
Síndrome Gorlin	<i>PTCH1-PTCH2</i>	Dominante	1/57.000
Hiperparatiroidismo	<i>HRPT2</i>	Dominante	Sin datos
Leiomatosis uterina y cáncer renal hereditarios	<i>FH</i>	Dominante	Sin datos
Melanoma maligno familiar	<i>CDKN2A-CDK4</i>	Dominante	1/10.000
Neurofibromatosis 1	<i>NF1</i>	Dominante	1/3.500
Neurofibromatosis 2	<i>NF2</i>	Dominante	1/40.000
Síndrome Nijmegen	<i>NBS1</i>	Recesivo	Sin datos
Paraganglioma familiar	<i>SDHB, SDHC, SDHD, SDH5</i>	Dominante	Sin datos
Poliposis asociada a <i>MUTYH</i>	<i>MUTYH</i>	Recesivo	Sin datos
Síndrome Rothmund-Thomson	<i>RECQL4</i>	Recesivo	Raro
Síndrome Simpson-Golabi-Behmel	<i>GPC3, CXORF5</i>	Ligado a X recesivo	Raro
Síndrome linfoproliferativo ligado al X	<i>SH2</i>	Ligado a X recesivo	Raro
Síndrome de Soto	<i>NSD1</i>	Esporádico	Raro
Síndrome Werner	<i>RECQL2</i>	Recesivo	1/50.000- 1/1000.000
Xeroderma pigmentosum	<i>XPA, XPC, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, DDB2, POLH</i>	Recesivo	1/250.000- 1/1.000.000

Tabla 5.12. Algunos de los Síndromes de cáncer hereditario

Iniciando en 1996, la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), introdujo las primeras recomendaciones para la realización de pruebas que valoran la susceptibilidad genética al cáncer, estableciéndolas como parte del cuidado médico de las personas que están en riesgo de padecer un tumor hereditario (Lindor, McMaster, Lindor, & Greene, 2008). ASCO recomienda que se debe ofrecer una prueba de pesquisa genética en cáncer cuando existan las siguientes condiciones (Robson, Storm, & Weitzel, 2010):

- Historia personal o familiar que sugiera susceptibilidad al cáncer hereditario
- La prueba pueda ser adecuadamente interpretada en el contexto clínico
- Los resultados de la prueba ayudarán al diagnóstico o influirán en el manejo médico o quirúrgico de los pacientes o miembros de la familia con riesgo de cáncer hereditario.

Es importante mencionar que dado que las pruebas de ADN generalmente se realizan en sangre, a los pacientes que han recibido trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas, se les debe realizar las pruebas genéticas a partir de ADN extraído de cultivo de fibroblastos (Wood, 2015).

En las últimas décadas se han desarrollado paneles multigenes, con el propósito de abordar la heterogeneidad genética que presentan condiciones relacionadas con el riesgo de desarrollar cáncer hereditario; estos paneles incluyen genes de alta penetrancia asociados a un cáncer específico o, en otros casos, incluyen además genes de moderada penetrancia (Hall, Forman, Pilarski, Wiesner, & Giri, 2014).

Actualmente, la ASCO recomienda el uso de paneles multigénicos basados en secuenciación de siguiente generación, algunos de los cuales se relacionan en la tabla 5.13.

Prueba	Condición evaluada	Método de análisis	Laboratorio	Genes analizados	Referencia
BRCA full risk	Cáncer mama/ovario	NGS	GeneID	26	http://www.admdia.com/
Breast plus panel	Cáncer de mama	NGS	Quest Diagnostics	<i>TP53, STK11, PTEN, CDH1, PALB2</i>	http://www.questdiagnostics.com/
CancerNext	Cáncer de mama/ovario, cáncer colorrectal, síndrome Lynch, melanoma,	NGS, MLPA	Ambry Genetics	32 genes	http://www.ambrygen.com/

	cáncer de ovario, cáncer pancreático, poliposis, cáncer uterino				
Cáncer somatic mutation panel	Cáncer mama/ovario, cáncer de colon, cáncer gástrico difuso, cáncer pulmonar	NGS	Stanford	45 genes	http://www.stanfordlab.com/esoteric/test-cancer-somatic-mutation-panel

Tabla 5.13. Paneles genéticos de utilidad en oncología.

5.5.8 Cribado de defectos genéticos pulmonares

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética que afecta entre otros órganos a los pulmones, tiene una herencia autosómica recesiva y es causada por una mutación en el gen *CFTR Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, que sintetiza una proteína del mismo nombre, la cual participa en la homeostasis de líquidos en las mucosas (Kharrazi et al., 2015). Desde el punto de vista epidemiológico la fibrosis quística tiene una incidencia de 1:3.000 a 1:4.000 nacidos vivos en la población caucásica y judía, en la población latinoamericana es de 1:4.000 a 1:10.000 recién nacidos vivos; así mismo se encuentran grupos étnicos y países donde la frecuencia de portadores es alta, como por ejemplo los judíos Askenazi y las personas provenientes de las provincias francoparlantes en Canadá, donde es de 1:25 (Sanders & Fink, 2016).

En 1979 surgió el primer método de cribado para fibrosis quística, basado en la detección de niveles de tripsina en sangre a través de radioinmunoensayo (Crossle, Elliot, & Smith, 1979), con lo que se logra una tasa de detección del 96% (Dandona et al., 1981); en la década de 1980, se comenzó a implementar en diferentes países como el Reino Unido, Australia, entre otros (Heeley, Heeley, King,

Kuzemko, & Walsh, 1982) y desde el 2013 el 62% de los diagnósticos de FQ se realiza partiendo de los resultados de las pruebas de cribado (Cystic Fibrosis Foundation, 2013).

En algunas poblaciones humanas, la ACMG recomienda aplicar un panel de mutaciones y variantes para fibrosis quística como parte de un programa de pesquisa poblacional, con el propósito de determinar el estado de portador de alguna de las mutaciones en el gen *CFTR* (Watson et al., 2004); de acuerdo a la población cribada, se pueden lograr tasas de detección de hasta el 49% en población asiática, 72% en latinoamericanos, 88% en blancos no hispanicos y 94% para judíos Askenazi (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics, 2011), a continuación se describen algunos de las pruebas disponibles comercialmente.

Referencia	Prueba	Mutaciones en el gen <i>CFTR</i> analizadas
http://www.questdiagnostics.com/testcenter/testguide.action?dc=TS_CFvantage_e_CF_Expanded_Screen	CFvantage®	132
	Cystic Fibrosis Screening test	23
	Ashkenazi Jewish Panel (4 test) ^(a)	32
	Ashkenazi Jewish Panel (11 test) ^(a)	32
http://www.ambrygen.com/tests/cystic-fibrosis-testing	CF Amplified™	132
	CF 102	102
https://www.sequenom.com/tests/	HerediT® ^(a)	119
http://moleculartestinglabs.com/product/ctfr/	Cystic Fibrosis Carrier Screening	Sin datos

Tabla 5.14. Pruebas de cribado para fibrosis quística disponibles comercialmente. ^(a) el panel HerediT®, además del análisis del gen *CFTR*, incluye otros genes implicados en el desarrollo de algunas patologías hereditarias.

A continuación se muestran algunos resultados de pruebas de secuenciación del gen *CFTR* positivas para fibrosis quística, así como los cambios presentados a nivel de la proteína.

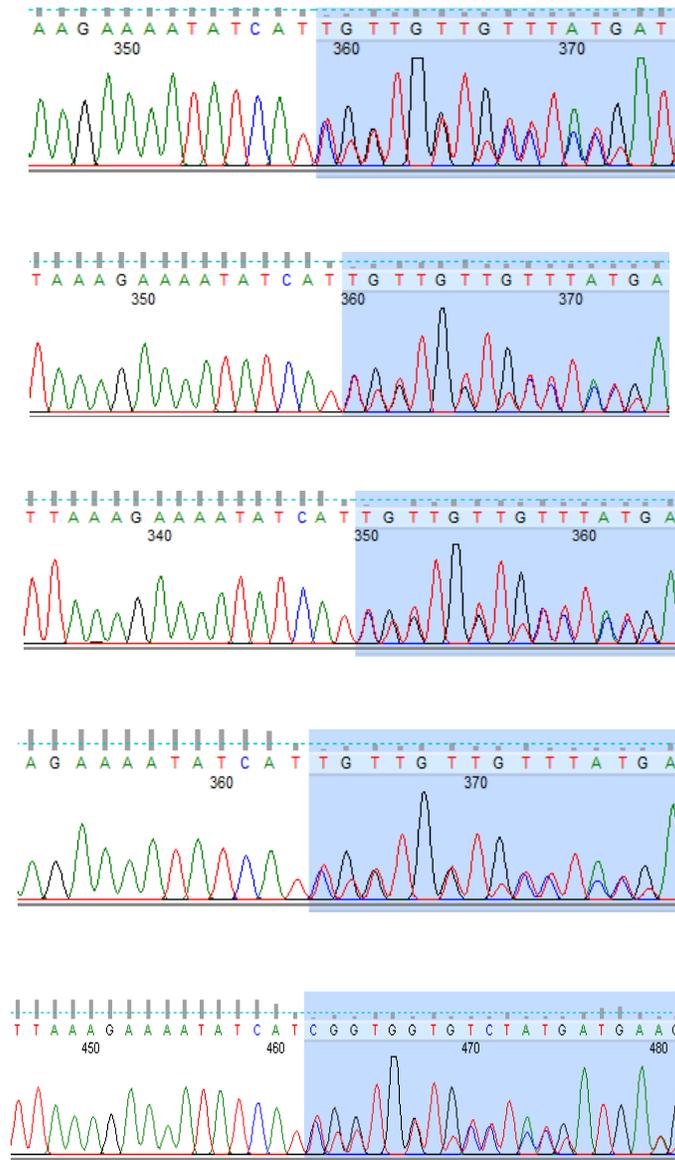


Imagen 5.18. Electroforetogramas con la variante c.1521_1523delCTT heterocigota (p.Phe508del)

Cortesía del biólogo Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

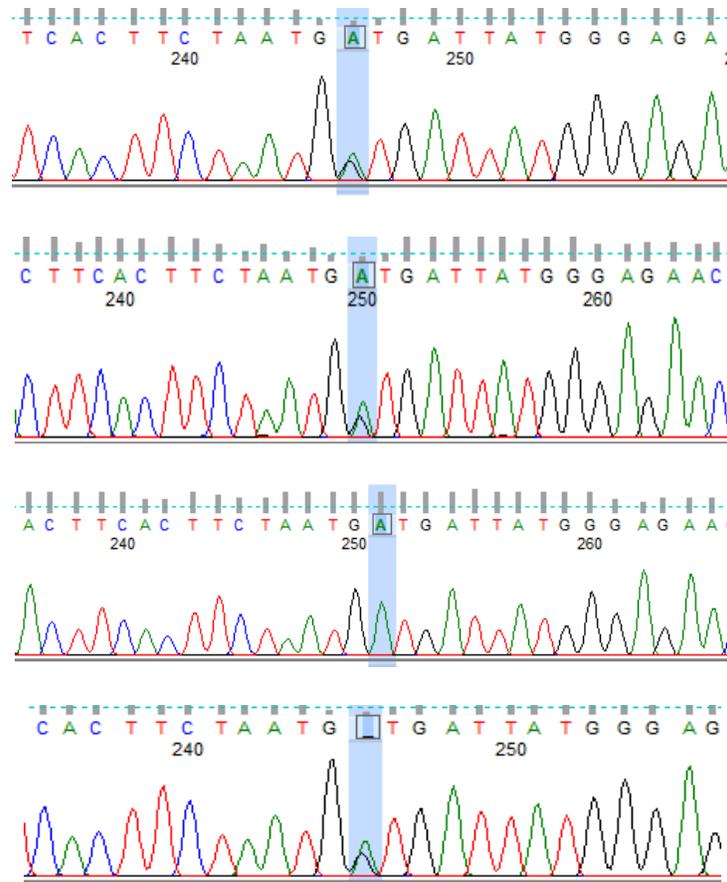


Imagen 5.19. Electroforetogramas que indican el polimorfismo c.1408G>A (p.Val470Met) heterocigota/homocigota en el exón 11. Cortesía del biólogo Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

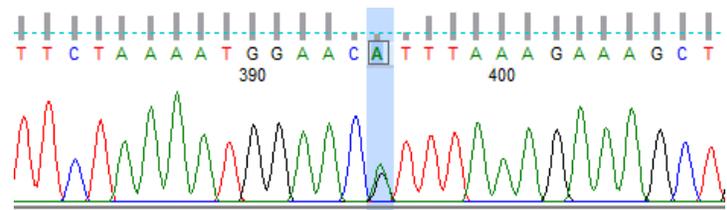


Imagen 5.20. *CFTR* exón 14: c.1826A>G heterocigota (p.His609Arg) (dbSNP: rs397508310). Cortesía del biólogo Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

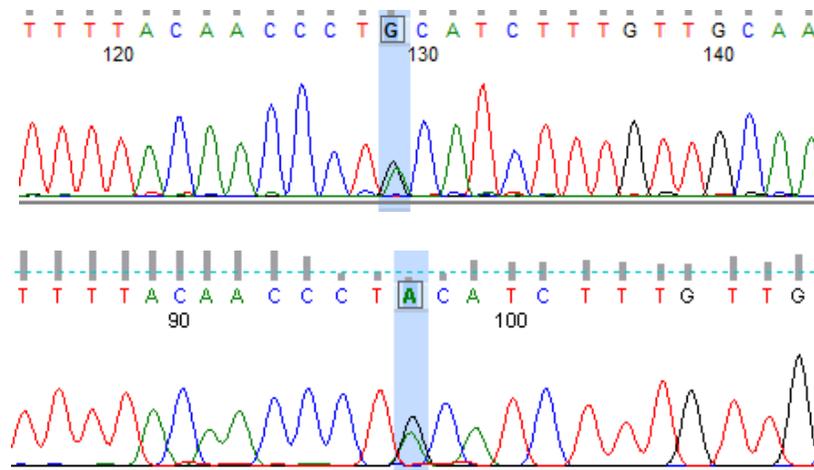


Imagen 5.21. *CFTR* exón 19: c.3041A>G heterocigota (p.Tyr1014Cys) (dbSNP: rs149279509) Cortesía del biólogo Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia.

5.5.9 Cribado preimplantacional

Las pruebas de cribado preimplantacional permiten identificar alteraciones cromosómicas, principalmente translocaciones y algunas alteraciones de único gen (Dahdouh et al., 2015). El primer esbozo de cribado preimplantacional surgió en la década de 1980 cuando se comenzó a utilizar la PCR para determinar el sexo de embriones de pacientes portadores de patologías ligadas al X (a H. Handyside, Kontogianni, Hardy, & Winston, 1990), de esta forma se podía identificar los embriones tanto sanos como portadores de mutaciones en el cromosoma X, así fue posible seleccionar y transferir embriones sanos.

Debido a que este procedimiento era realizado únicamente en parejas con antecedentes conocidos de enfermedad ligada al sexo, la posibilidad de detectar estas mismas alteraciones cuando se presentaban *de novo* era muy baja, por lo que se propuso la realización de un cribado genético preimplantacional de enfermedades ligadas a X en otras condiciones como por ejemplo, la edad materna avanzada, en infertilidad masculina o en los casos de baja tasa de embarazo en mujeres

con fertilización *in vitro*, consolidándose de esta forma las pruebas de pesquisa preimplantacional (Mastenbroek et al., 2007).

Es importante anotar que a diferencia de los métodos anteriores, el cribado preimplantacional se realiza en el escenario de la fecundación *in vitro*, por lo que el material genético se obtendrá a partir de células provenientes del blastocisto, una cantidad aproximada de 5–10 células, tomadas entre los días 3 o 5 de desarrollo embrionario (R. T. Scott et al., 2013).

En las primeras etapas de este cribado se utilizaron métodos como FISH (Levinson et al., 1995), que permite el análisis de entre 5 a 12 cromosomas; sin embargo se identificó que las aneuploidías pueden presentarse con significancia clínica en la mayoría de los 23 pares de cromosomas (P R Brezina et al., 2016), lo cual contrasta con el poder limitado de detección de la FISH, disminuyendo de igual forma la tasa de éxito del embarazo. El otro método utilizado en las primeras etapas del cribado preimplantacional fue la PCR, para los casos de mutaciones puntuales, que presentó un muy buen desempeño en la identificación de mutaciones puntuales en casos de Tay-Sachs y fibrosis quística por mencionar algunas (Tsai, 2000).

Sin embargo, con la evolución de la biología molecular, estos métodos han sido reemplazados por otros con menor grado de complejidad técnica y mayor precisión, entre los que encontramos la Hibridación Genómica Comparada con arreglos (*arrays*) -aCGH- (Dahdouh et al., 2015), la secuenciación de siguiente generación -NGS- (*Next Generation Sequence*) (Koboldt, Steinberg, Larson, Wilson, & Mardis, 2013) y el *Karyomapping* (A. H. Handyside et al., 2010); este último se encuentra aún en proceso de validación.

La aCGH permitió un aumento del 42% en la detección de variación en el número de cromosomas (trisomías o monosomías completas o parciales) y translocaciones cromosómicas no balanceadas con respecto al FISH (Rawe & Cuzzi, 2012), permitiendo el aumento de la tasa de embarazo exitoso

llegando a ser de 75%, debido a la eficacia en la transferencia de un embrión correctamente cribado; esto es logrado por la capacidad de analizar los 23 pares de cromosomas, además de ello muestra una sensibilidad y una especificidad cercana al 100% (Fiorentino et al., 2014).

La secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequence NGS*), fue propuesta por Treff y colaboradores como método para el diagnóstico y cribado preimplantacional (Treff et al., 2013), debido a su capacidad para la detección no solo de alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas, sino también por la posibilidad de identificar mosaicos que se encuentren en proporciones que oscilan entre el 20-50% y la identificación de defectos monogénicos (Paul R. Brezina, Anchan, & Kearns, 2016); en un estudio comparativo entre la aCGH y NGS para la detección de aneuploidías en embriones en estado de blastocito, realizado por Fiorentino y colaboradores, se encontró que la NGS tiene una concordancia del 99.5% con respecto a los hallazgos efectuados por la aCGH; de igual manera se reporta una sensibilidad y una especificidad entre el 99.98% y el 100% (Fiorentino et al., 2014).

En la actualidad diferentes métodos de cribado preimplantacional se encuentran disponibles comercialmente, en la tabla 5.15 se relacionan algunos de ellos.

Laboratorio	Prueba	Método	Condición analizada
http://www.genedx.com/	Panel de Aneuploidías	FISH	Aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X y Y
	Panel cromosómico por micro arreglos	aCGH y SNP	Síndromes de micro duplicación o micro delección, disomías uniparentales de los cromosomas 6, 7, 11, 14, 15 y 20,
	Micro arreglos cromosómicos del genoma completo	aCGH y SNP	Síndromes de micro duplicación o micro delección, duplicaciones, delecciones

	para productos de la concepción		subteloméricas, disomías uni parentales
https://genesisgenetics.org/pgs/ngs/	Cribado genético preimplantacional	NGS	Análisis de los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X y Y, enfermedad de Huntington, distrofia muscular progresiva, fibrosis quística, síndrome de X frágil, entre otras.
http://www.igenomix.us/test/preimplantation-genetic-screening-pgs/	PGS 24 Chromosomes	NGS	Análisis de aneuploidías en los 23 pares de cromosomas.
https://www.cincinnaticildrens.org/service/d/diagnostic-labs/cytogenetics/preimplantation-genetic-screening/	24sure array kit	aCGH	Análisis de aneuploidías en los 24 tipos de cromosomas (22 autosomas, cromosoma X y cromosoma Y
	VeriSeq™ PGS kit	NGS	Análisis de aneuploidías en los 24 tipos de cromosomas (22 autosomas, cromosoma X y cromosoma Y.
http://www.mountsinaires.com/personalized-medicine/pre-implantation-genetic-screening/	PGS: Aneuploidy screening	aCGH	Análisis de aneuploidías en los 24 tipos de cromosomas (22 autosomas, cromosoma X y cromosoma Y.
	PGS: Aneuploidy and translocation diagnosis	aCGH	Detección de aneuploidías, caracterización de translocaciones no balanceadas y otras anomalías estructurales

Tabla 5.15. Pruebas disponibles comercialmente para el cribado preimplantacional

5.6 Cribado para grupos étnicos

Un factor que puede aumentar la frecuencia de una patología de origen genético es la endogamia, la cual se puede presentar por razones geográficas, culturales o religiosas, entre otras, haciendo que

algunas patologías sean más frecuentes en determinados grupos étnicos; sin embargo una frecuencia aumentada de una condición en particular en un determinado grupo poblacional no es solo producto de la endogamia, además, el efecto fundador o la selección positiva (por factores ambientales como malaria o cólera), probablemente intervienen para que una población sea proclive a portar una variante genética que les brinde una ventaja en particular (Goodman & Percy, 2005; Wambua et al., 2006).

La posibilidad de intervención en la persona afectada hace que la realización de una prueba de cribado tenga mayor valor en estos grupos étnicos, a continuación se hará un resumen de las pruebas genéticas establecidas para el cribado en grupos étnicos específicos.

Patología	Población afectada	Prueba de cribado	Prueba confirmatoria
α-talasemia	Mediterránea, oriente medio	HPLC, Isoelectroenfoque	RQ-PCR
β-talasemia	Mediterráneo este, medio este africano, sur este asiático	HPLC, electroforesis capilar, electroforesis acida	RQ-PCR
Anemia de células falciformes	África sub-sahariana	HPLC, electroforesis capilar, electroforesis acida	RQ-PCR
Fibrosis quística	Canadá	Iontoforesis	Secuenciación

Tabla 5.16. Patologías cribadas de acuerdo a los grupos étnicos.

Un grupo poblacional que tiene especial relevancia son los judíos Askenazí, quienes presentan una alta frecuencia del estado de portador para algunas patologías hereditarias, las cuales se resumen en la tabla 5.17 (Hoffman et al., 2014); por esta razón el *American College of Obstetricians and Gynecologists* ha sugerido que se ofrezcan pruebas de cribado para un grupo específico de

enfermedades a todas las parejas provenientes de este grupo étnico (Monaghan, Feldman, Palomaki, & Spector, 2008). En la actualidad se cuenta comercialmente con distintos paneles que analizan de forma conjunta estas patologías logrando una tasa de detección entre 95% - 99%, en la tabla 5.18 se describen algunas de las pruebas.

Patología	Gen afectado	Herencia	Descripción	Frecuencia de portador
Enfermedad de Canavan	<i>ASPA</i> (E285A) 85%	AR	Hipotonía axial, hiperextensión de piernas, flexión de brazos, ceguera, retraso en el desarrollo, y megalencefalia	1/57
Enfermedad de Gaucher	<i>GBA</i> 73% (N370S) tipo I 3.1% (L444P) tipo II - III	AR	Hepatoesplenomegalia, pancitopenia, células de Gaucher en medula ósea, pinguecula e hiperpigmentación	1/15
Anemia de Fanconi	<i>FANC</i> 15 grupos de complementación (A-Q)	AR – XL	Retardo en el crecimiento pre y post-natal, malformaciones esqueléticas (radio y pulgar), corazón y riñones, facies características (boca, ojos y cabeza pequeña), sordera, hipogonadismo, hiper o hipo pigmentación, fallo medular y susceptibilidad al cáncer	1/89
Enfermedad de Tay-Sachs	<i>HEXA</i> , inserción de 4 bp en exón 11 79%	AR	Retardo en el desarrollo, parálisis, demencia, ceguera	1/30
Niemann-Pick	<i>SMPD1</i> , R608del en tipo B, 9% A483E, en tipo A 38%	AR	Tipo A: hepatoesplenomegalia, retardo del desarrollo, déficit intelectual, hipotonía, rigidez, ictericia, convulsiones, sordera, temblor, psicosis o demencia	1/90

	<i>NPC1</i> , I1061T, P1007A			Tipo B: hepatoesplenomegalia, disfunción pulmonar, no hay compromiso neurológico.	
	<i>NPC2</i> , 58% E20X			Tipo C: ataxia, convulsiones, espasticidad, mioclonia, oftalmoplegia vertical supra -nuclear, demencia y manifestaciones psiquiátricas	
ML tipo IV	<i>MCOLN1</i> , 78% IVS3-2A-G, 21.85% delEx1- Ex7	AR		Retraso psicomotor, opacidad de la córnea, degeneración retiniana, estrabismo,	1/127
MSUD	<i>BCKDHA</i> IA Y393N, G204R	AR		Encefalopatía, presencia de orina con olor a maple	1/81
	<i>BCKDHB</i> IB 11BPdel, R183P, H156Y, V69G, 4BPdel IVS9				
	<i>DBT</i> II 124BPdel, F215C, 17BPins, 126BPins, I37M				
Síndrome Bloom	<i>RECQL3</i>	AR		Retraso en el desarrollo, dolicocefalia, talla baja, infecciones frecuentes, reflujo gastroesofágico, susceptibilidad al cáncer	1/100
Enfermedad de depósito de glucógeno tipo I	<i>G6PC</i>	AR		Retraso psicomotor, hepatoesplenomegalia, diátesis hemorrágica, angiomas, baja tolerancia al ayuno, hipoglicemia	1/71
Atrofia muscular espinal	<i>SMA1</i>	AR		Hipotonía progresiva grave	1/67
Disautonomía familiar	<i>IKBKAP</i> 97% IVS20DS, T-C,+6	AR		Disminución en lágrimas, disfagia, dismotilidad esofágica y gástrica,	1/27

3% R696P	reflujo gastroesofágico, hipotensión
1 caso P914L	postural, crisis hipertensivas, hiporeflexia, ataxia progresiva

Tabla 5.17. Patologías hereditarias susceptibles de cribado en población judía, MSUD enfermedad de orina con olor a jarabe de arce.

Panel	Patologías analizadas	Tasa de detección	Referencia
Panel para judíos Askenazi	Fibrosis quística, enfermedad de Canavan, Enfermedad de Gaucher, Anemia de Fanconi, Síndrome Bloom, Enfermedad de Tay Sachs, Disautonomía Familiar, enfermedad Niemann-Pick, Mucopolipidosis tipo IV, Enfermedad por depósito de glucógeno, Enfermedad por orina con olor a jarabe de arce	95% - 99%	http://www.questdiagnostics.com/testcenter
Panel de cribado para judíos Askenazi	Síndrome Bloom, Enfermedad de Canavan, Disautonomía Familiar, Anemia de Fanconi, Mucopolipidosis tipo IV, Enfermedad Niemann-Pick, Enfermedad de Tay Sachs	95% - 99%	www.sickkids.ca
Panel completo para judíos Askenazi	Síndrome Bloom, Enfermedad de Canavan, Disautonomía Familiar, Anemia de Fanconi, Mucopolipidosis tipo IV, Enfermedad Niemann-Pick tipo A y B, Enfermedad de Tay Sachs, atrofia muscular espinal, deficiencia de dihidrolipoamida deshidrogenasa, hiperinsulinismo familiar, enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, Síndrome Usher, Síndrome Jubert.	>99%	https://nxgenmdx.com/lab-test/comprehensive-ashkenazi-jewish-panel/

Tabla 5.18. Paneles de cribado para patologías más frecuentes en judíos Askenazi.

De la misma forma, se ha evidenciado la presencia de mutaciones en el gen *BRCA1* y *BRCA2* (John et al., 2007) que son propias de este grupo étnico por lo que se ha sugerido el cribado de estas mutaciones específicas en esta población.

Prueba	Mutaciones evaluadas	Precisión
<i>BRCA1/2 Ashkenazi Founder Panel</i>	<i>BRCA1</i> 187delAG, 5382insC <i>BRCA2</i> 6174delT	95% - 99%
<i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (BRCA1-BRCA2 related selected mutations)</i>	<i>BRCA1</i> 187delAG, 5382insC <i>BRCA2</i> 6174delT	±99%
<i>BRC Advantage®, Ashkenazi Jewish screen</i>	<i>BRCA1</i> 187delAG, 5382insC <i>BRCA2</i> 6174delT	±99%
<i>Genetic Testing for Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndrome</i>	Código CPT 81212* <i>BRCA1</i> 187delAG, 5382insC <i>BRCA2</i> 6174delT	±99%

Tabla 5.19. Pruebas de cribado para mutaciones fundadoras en población judía Askenazi, * código para que se analice específicamente las mutaciones fundadoras judías.

5.7 Conclusión

En conclusión y como se ha descrito en los apartados anteriores, la oferta actual de métodos de cribado es amplia y variada y oscila desde métodos citogenéticos clásicos, pasando por aquellos no genéticos como las pruebas bioquímicas, estudios imagenológicos y otras formas de identificación de personas o familias en riesgo, hasta llegar en la actualidad a los análisis moleculares. Probablemente en este capítulo se escaparon de mención algunos otros métodos de pesquisa que también se encuentran en uso en las poblaciones humanas; todos estos métodos han permitido la identificación de un gran número de alteraciones genéticas y no genéticas. La identificación de una persona o familia en riesgo hace posible realizar intervenciones encaminadas a disminuir el impacto

de las mismas sobre la calidad de vida de los afectados, a través de medidas especiales de tratamiento, como por ejemplo dietas, terapias de reemplazo enzimático o seguimiento, tendientes a identificar complicaciones asociadas a la alteración o evitar su presentación en las generaciones futuras, al permitirle a los portadores tomar diferentes opciones reproductivas.

Uno de los aspectos que han permitido que las pruebas de cribado tengan impacto en el curso natural de una enfermedad es la optimización de los niveles de precisión, tales como la mayor sensibilidad y especificidad posible que se alcanzan en la actualidad, los cuales en algunos casos llegan a ser casi del 100%. Sin embargo, un factor que restringe el uso de una prueba de cribado particular es el costo de la misma, que hace que no pueda ser aplicada de forma masiva, evitando con esto el cumplimiento de una de las características de las pruebas de cribado.

Es importante tener en cuenta aquellos grupos poblacionales que presentan una susceptibilidad aumentada a presentar ciertos desordenes genéticos como por ejemplo cáncer o defectos metabólicos, entre otros, pueden ser sujetos a la aplicación en ellos de pruebas de cribado específicas.

Finalmente hay que recordar que las pruebas de cribado no son pruebas de diagnóstico; el hallazgo de un resultado positivo trae de la mano resultados que pueden ser falsos positivos y requieren de la realización de pruebas diagnósticas específicas y confirmatorias que identifique la noxa o causa del problema bajo análisis. De igual manera, es relevante expresar que en todos estos casos es indispensable la participación del asesor genético durante el proceso de cribado, principalmente cuando sea reportada una prueba como positiva, ésto con el fin de brindar una adecuada orientación sobre los posibles resultados de la prueba confirmatoria y las opciones de manejo que se tengan con respecto a una condición particular.

6. BIOBANCOS Y BANCO DE ADN/ARN.

Los biobancos (cuando éstos almacenan especímenes como tejidos o muestras sanguíneas) y los bancos de ADN/ARN, surgieron tras la necesidad de almacenar la información y las muestras de personas sanas o afectadas con padecimientos de índole genético, para el análisis presente y futuro de muestras de ADN, de ARN, sueros, plasma, proteínas y/o tejidos (Yates, Malcolm, & Read, 1989).

Uno de los biobancos más relevantes históricamente fue establecido por James Neel en los Estados Unidos de América, quien luego del lanzamiento de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki, realizó estudios de polimorfismos genéticos en las proteínas y estudios citogenéticos en los sobrevivientes y su descendencia, a partir de muestras que han sido conservadas desde esa época hasta la actualidad (Neel & Schull, 1991).

Los biobancos de ADN aparecen en la década de los años 1980s, como una iniciativa gestada por los grupos de distrofia muscular (Yates et al., 1989); dentro de las aplicaciones propuestas para el material genético almacenado, se encontraba la confirmación diagnóstica de la enfermedad, el diagnóstico prenatal, la detección de portadores y el diagnóstico pre-sintomático. Seguidamente se formaron bancos para almacenar muestras en otras patologías genéticas como: fibrosis quística, enfermedad de Huntington, inmunodeficiencias y hemofilia. Además, existen bancos que mantienen un registro de enfermedades genéticas en adultos mayores y en aquellos afectados cuya expectativa de vida es corta (Reijs et al., 2015; Sudlow et al., 2015). Un ejemplo relevante es la cohorte de Rotterdam, en la cual se incluye entre otros: el estudio iniciado en 1990 sobre los factores que determinan la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares neurológicas, oftalmológicas, endocrinológicas y psiquiátricas en personas mayores de un suburbio en Rotterdam

(Holanda) y en el que además, se incluye el análisis y la conservación de muestras biológicas (Hofman A et al., 2012).

A nivel mundial se pueden encontrar bancos que almacenan muestras de tejido y de material genómico de personas con patologías de inicio a edad temprana como de inicio en la adultez, en la tabla 6.1 se relacionan algunos de ellos. Colombia, se puede citar el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU), de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá

<http://www.saludcapital.gov.co/HEMO/Paginas/BancodeCelulasdeCordonUmbilical.aspx>

Bio-banco	Localización	Enfermedad
Centro Clínico Universidad de Pecs	Budapest, Hungría	Fibrosis quística
European Central Bank of Neurodegenerative Disease	Luxemburgo	Alzheimer
Integrated BioBank of Luxembourg	Luxemburgo	Cáncer, diabetes, Parkinson, Alzheimer y otros
Saint Luc Tumor Bank	Bruselas	Cáncer
Danubian Biobank Consortium	Regensburg, Alemania	Desordenes del envejecimiento
National Biobank of Finland	Helsinki, Finlandia	Desordenes urológicos, hematológicos, del espectro autista, psiquiátricos y otros
BioBank Ireland Trust	Dublín, Irlanda	Cáncer
Pulmonary Biobank Consortium	Mallorca, España	Desórdenes pulmonares (exposicionales)
Quebec Leukemia Cell Bank	Montreal, Canadá	Leucemia
Canadian Biosample Repository	Edmonton, Canadá	Repositorio diferentes muestras

National Laboratory for the Genetics of Israeli populations	Tel Aviv, Israel	Líneas celulares humanas provenientes de la población israelita
UCSF DNA Bank	San Francisco, EEUU	Repositorio muestras de ADN
Genetic Alliance Biobank	Washington, EEUU	Repositorio muestras de ADN de enfermedades raras
DANA FARBER Biobank	Boston, EEUU	Cáncer y otros (por demanda)
Store-a-tooth Stem cell bank	Lexington, EEUU	Células madres dentales
The Folio Biosciences Biobank	Powell, EEUU	Cáncer, desordenes autoinmunes o neurológicos
Iran National Tumor Bank	Teherán, Irán	Cáncer

Tabla 6.1 Biobancos para muestras de enfermedades de inicio en la edad adulta, modificado de <http://specimencentral.com/biobank-directory/>

Los avances en el estudio del cáncer hereditario y esporádico han ampliado el uso de la información genética a los tejidos y otros especímenes. En estos casos, se almacenan los bloques de parafina que contienen diversos tumores junto con datos de la información personal y clínica pertinente, sobre los cuales hoy se adelantan estudios genómicos y de expresión para desvelar los eventos causales del cáncer, identificar marcadores de diagnóstico y pronóstico e incluso realizar acciones preventivas en los familiares de un enfermo con una forma de cáncer hereditaria (Araújo, Gomes, Teixeira, Coelho, & Medeiros, 2015).

6.1 Tipos de biobancos

En la actualidad se han identificado diferentes tipos de biobancos: en primera instancia, McEwen y colaboradores proponen una clasificación de acuerdo a la finalidad de los biobancos, los cuales son divididos en 4 tipos a saber: en primer lugar los bancos que tienen un fin académico; en segundo lugar, los bancos con fines comerciales que ofertan sus repositorios con ánimo de lucro; en tercer lugar están los bancos que almacenan información genética con fines forenses y, por último, están los bancos militares, orientados al cuidado de muestras de personas involucradas en conflictos bélicos con propósito de identificación (McEwen & Reilly, 1994).

Adicionalmente Rebullá y colaboradores en una revisión sobre los biobancos principalmente Europeos, encontró diferentes tipos de biobancos, los cuales fueron clasificados de acuerdo a su misión y objetivos, agrupándose en 6 tipos a saber:

- Biobancos de restos de tejidos: en él se almacenan tejidos provenientes de muestras anatómicas y de muestras de patología.
- Biobancos poblacionales: almacenan muestras obtenidas de la población general de forma aleatoria, sin que estas personas estén relacionadas con una condición en particular.
- Biobancos de gemelos: contienen muestras provenientes de una población específica que son las parejas de gemelos.
- Biobancos de enfermedades: almacena muestra de personas con una condición particular, por ejemplo cáncer, enfermedades neuromusculares etc.
- Biobancos de órganos: las muestras almacenadas son órganos completos, con el propósito de trasplantes.
- Biobancos no humanos: las muestras almacenadas en este tipo de bio-banco son provenientes de organismos como primates, mamíferos marinos, e incluso plantas.

Los biobancos conservan especímenes biológicos o tejidos relacionados con el interés de entender la causa de las enfermedades, los mecanismos biológicos, moleculares o ambientales responsables de las mismas y traducir la investigación biomédica en beneficios tangibles para la población, en lo que se denomina medicina traslacional.

6.2 Legislación sobre biobancos

Dado que la conservación de la información y las muestras o especímenes ofrece retos que se relacionan con aspectos sociales, políticos y éticos importantes y, tomando en cuenta el amplio campo de actividades que se desprende del uso de estos por los bancos de ADN y los biobancos, los países han definido normas y regulaciones para el funcionamiento de estos.

País	Legislación	Características	Referencia
Argentina	Ley N° 25.511 de 1987	Creación del Banco Nacional de Datos Genéticos	(Iopez, 2013)
Islandia	Act on Health Sector Database, N° 139/1998	Creación y operación de base de datos del sector salud	(Welfare, 2012)
Finlandia	Act N° 101/2001	Disposición sobre la donación, extracción, almacenamiento y uso de órganos, tejidos y células humanas para el uso medico	(Ministry of Social Affairs and Health, 2012)
Suecia	Act N° 297/2002	Regulación para la recolección, almacenamiento y uso de material biológico humano, respetando la integridad personal del individuo	http://www.vavnad.se/cms/sites/Biobanken/home/in-english.html
Noruega	Act N° 12/2003	Regulación para el uso de células humanas en diagnóstico y terapia	(Bjugn & Gjertsen, 2012)

Italia	Decreto 191/2007 y la guía sobre los biobancos genéticos 2004	Marco general para la calidad y seguridad de tejidos y células humanas. Definición y caracterización de biobancos genéticos	(Calzolari, Napolitano, & Bravo, 2013)
Reino unido	Human Tissue Act 2004	Regulación para la extracción, almacenamiento de órganos humanos y otros tejidos	(Price, 2005)
Nueva Zelanda	Guidelines for the use of Human Tissue for Unspecified purposes	Marco regulatorio y requerimientos para el uso de tejidos humanos para investigación.	(Ministry of Health, 2007)
España	Real decreto 1716/2011	Requisitos básicos y de funcionamiento de los biobancos y se regula el funcionamiento y organización del registro nacional de biobancos	(Novoa, 2012)
Brasil	Decreto 2201 de septiembre 14 de 2011	Guías brasileñas para los repositorios y biobancos de materiales biológicos humanos con propósito de investigación.	(Marodin, Braathen, Motta, Maria, & Santos, 2013)

Tabla 6.2 legislación sobre biobancos a nivel mundial, modificado de (Cabrera et al., 2010; C. T. Scott, Caulfield, Borgelt, & Illes, 2012).

En Colombia no se cuenta con una legislación específica para los bancos de ADN; sin embargo, es posible aplicar normas como la ley 09 de 1979 que en su título IX artículo y su reglamentación a través del decreto 1571 de 1993 por el cual se dictan disposiciones para el funcionamiento de establecimientos dedicados a la extracción, procesamiento, conservación y transporte de sangre total y sus derivados (Colombia, 1993), las cuales pueden ser aplicadas principalmente en los biobancos, por otro lado, se cuenta también con normatividad relacionada con la investigación en

seres humanos y en muestras de tejido humano que contempla aspectos técnicos y éticos (Cabrera et al., 2010).

La resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud Pública, establece normas técnicas y administrativas para la investigación en salud, dado relevancia al protección del participante en el estudio, así mismo proporciona lineamientos cuando se trate de investigación en comunidades y grupos especiales que requieran medidas de protección adicional como es el caso de los menores de edad, discapacitados, mujeres embarazadas, grupos subordinados, entre otros. Adicionalmente se contemplan lineamientos específicos cuando se realicen investigaciones con tejidos humanos, ácidos nucleicos o investigación con animales.

El decreto 1101 del 2001, implementa la Comisión Intersectorial de Bioética, con el propósito de asesorar al gobierno nacional en temas de bioética y asuntos relacionados con investigación en humanos, investigación sobre el genoma humano, así como otro tipo de investigación biomédica, como por ejemplo la extracción de tejidos, fertilización in vitro, trasplante de órganos entre otros.

6.3 Ética en biobancos

De la misma forma que se han promulgado normas para evaluar el desempeño de los bancos de ADN y los biobancos, se ha establecido un marco ético para proteger la integridad de las personas (Stjerschantz & Mats, 2013). La UNESCO promulgo la declaración universal sobre el genoma humano y los derechos humanos; así mismo, se implementó una declaración sobre bioética y los derechos humanos. Con ambas se buscó salvaguardar principios como la dignidad humana y los derechos humanos, el principio de beneficencia y no maleficencia, los de autonomía y responsabilidad individual, el consentimiento, la protección a personas carentes de capacidad para dar su consentimiento, la protección a personas y grupos vulnerables, los derechos a la privacidad

y confidencialidad, a la igualdad, justicia y la equidad, el derecho a la no discriminación ni estigmatización, al respeto a la diversidad cultural y el pluralismo, a la solidaridad y cooperación, a la responsabilidad social y la salud, al aprovechamiento compartido de los beneficios, a la protección de las generaciones futuras y finalmente, a la protección del medio ambiente, la biosfera y la biodiversidad (Lenoir, 1997)

Adicionalmente a lo promulgado por la UNESCO, otros estamentos de carácter internacional han establecido normatividades para ampliar la protección a las personas que se encuentran involucradas en investigaciones, no solo ellos como objeto de estudio, sino también las muestras de tejidos que son tomadas de ellos. Con este fin, organizaciones como la OMS (Organización Mundial de la Salud) y su programa de genética humana, establecieron en 1998 una guía sobre temas éticos en genética médica y en servicios de genética (Organization & Programme, 2003)

De la misma forma, HUGO (*Human Genome Organization*), dependiente de la UNESCO y entidad científica encargada de promover la cooperación internacional dentro del proyecto de genoma humano, ha realizado aportes sobre el manejo de las muestras de ADN y la protección de las bases de datos genómicas. Para dar cumplimiento a estas directrices, se implementó el uso del consentimiento informado. No obstante, se dejaron por fuera del consentimiento informado aspectos como la disposición final de la muestra luego de realizar el estudio para el cual fue tomada, por lo que es necesario incluir preguntas específicas para definir si se autoriza el uso posterior de la muestra en otros estudios, o si esta muestra debe ser desechada; de esta manera, se ha estructurado un consentimiento informado ampliado, que incluye éste y otros temas relevantes para el uso de material genético (Strech, 2015).

Antes de proceder a la recolección de las muestras, se debe obtener la autorización de la persona fuente del material genético, para que este pueda ser tomado, almacenado y, cuando sea

requerido, pueda ser usado con fines de diagnóstico o investigación, para ello se debe estructurar un consentimiento informado (Godard et al., 2003), avalado por el comité de ética institucional, (Salvaterra et al., 2008). Si bien es cierto, los bancos de ADN pueden tener un propósito de investigación, también pueden servir como sitio de almacenamiento de muestras para propósitos particulares como la identificación de mutaciones familiares.

6.4 Proceso de recolección, análisis y almacenamiento de una muestra

6.4.1 El consentimiento informado en biobancos y bancos de ADN/ARN

El consentimiento informado debe abarcar 3 aspectos, el primero debe contemplar la autorización de la persona para recolectar los datos y las muestras, el segundo aspecto implica el consentimiento del uso de esta información con propósitos investigativos y por último se debe tener el consentimiento para la utilización de la información en terceros o el uso del material genético en otras investigaciones (Shickle, 2006).

Para lograr que la persona que aportara la muestra tenga un adecuado entendimiento del propósito de banco de ADN o del biobanco, es necesario que estén identificados los siguientes elementos (Beauchamp and Childress, 2001):

- I. Precondiciones
 - a. Competencia (para entender y decidir)
 - b. Voluntad (para decidir)
- II. Elementos de información
 - a. Discusión (material de información)
 - b. Recomendaciones

- c. Comprensión (del material de información y las recomendaciones)
- III. Elementos del consentimiento
- a. Decisión
 - b. Autorización

Frente al asunto de permitir o no la utilización de la información o del material genético en investigaciones futuras, es importante mencionar que la firma de un consentimiento informado por cada investigación en las que se pueda utilizar una muestra de ADN, conllevaría un aumento en el tiempo de realización de la misma, así como un aumento en el costo económico, por lo que es preferible la realización de un consentimiento general (Rumball & Smith, 2002).

Adicionalmente se debe incluir la necesidad o no de anonimizar las muestras, de acuerdo al propósito de su almacenamiento en el banco de ADN y definir el tiempo de almacenamiento de la muestra; finalmente es pertinente recordar que la firma del consentimiento informado debe ser libre, voluntaria y, el asesoramiento o información previo para obtener esta firma, debe ser realizado por un profesional entrenado que pueda despejar todas las incógnitas surgidas durante el proceso.

6.4.2 Recolección de muestras para los biobancos y bancos de ADN/ARN

Luego de la firma del consentimiento informado, donde la persona declara que conoce y acepta las condiciones para el procesamiento y almacenamiento de las muestras en el biobanco, se procede a la obtención del material genético, esto puede ser logrado a partir de diferentes fuentes; estas fuentes son seleccionadas de acuerdo a la finalidad que tenga el banco de ADN/ARN, es decir si es un repositorio de muestras aleatorias o, por el contrario, tiene por objeto el estudio de una condición específica, como por ejemplo un tumor.

Así mismo la calidad de la muestra de material genético depende del método a través de la cual es obtenida, la forma de transporte y de almacenamiento; estas condiciones tienen mayor relevancia cuando se trata de la extracción de ARN debido a la variabilidad en la vida media que pueda tener esta molécula, la cual puede ser de varias horas como por ejemplo el ARNm de la globina o de minutos como es el caso del ARNm del transcrito del gen *cis-fos* (Chyi-Ying A. Chen, Nader Ezzeddine, 2008), es por ello que se recomienda un tiempo máximo de 30 minutos desde el momento de obtención de la muestra hasta la congelación de la misma, cuando se pretenda extraer ARN y un tiempo menor de 2 horas cuando se piense en la utilización de ADN y proteínas (Florell et al., 2001)

Para la recolección de muestras aleatorias, el hisopado del interior de la mucosa oral es un método de elección frecuente y mediante el cual se recolectan células de la mucosa oral a través de barrido con un hisopo (Mulot, Stücker, Clavel, Beaune, & Loriot, 2005); el procedimiento consiste en la introducción del hisopo en la boca y a nivel de la cara interna de las mejillas realizando un frote circular durante aproximadamente 30 segundos, para lograr la mayor adherencia celular al hisopo (García-Closas et al., 2001), posteriormente se almacenan en tubos rotulados para luego realizar la extracción de ADN.

Otra forma utilizada para la obtener material genético, es a partir de sangre venosa, este método, más invasivo que el anterior, es ampliamente utilizado con este fin, debido al número elevado de células que se obtienen, lo que facilita la extracción de ADN (Gaaib, Nassief, & Al-assi, 2011); el procedimiento consiste en extraer una cantidad aproximada de 5-10 ml de sangre venosa, por medio de punción directa de una vena, esta muestra será contenida en un tubo con anticoagulante EDTA, el cual actúa como quelante del calcio evitando que las endonucleasas actúen y se logra la conservación de la muestra e integridad del ADN hasta la extracción del material genético.

En el caso de biopsias de tejido para el estudio de mutaciones somáticas en tumores, lo recomendable es realizar la congelación del tejido de manera inmediata, por ejemplo en nitrógeno líquido, sin embargo, también puede lograrse la extracción de ADN de muestras conservadas en bloques de parafina, pero la calidad del material genético puede verse afectada, debido a la degradación que este puede sufrir.

6.4.3 Extracción de ADN

Luego de tomada la muestra o espécimen se procede a la extracción de ADN/ARN, a través de métodos convencionales como *salting out*, o por medio de estuches comerciales de extracción de ADN, estos métodos pueden diferir en algunos aspectos técnicos. En general, se sigue un protocolo similar, el cual inicia con el lisado de las células, luego de esto se realiza la incubación con proteasas para la extracción de proteínas, seguidamente se realiza la separación del ADN de las proteínas y otros detritus y finalmente se precipita el ADN. A continuación encontrará la comparación sobre la cantidad de ADN obtenido a través de los diferentes métodos de extracción.

TIPO DE MUESTRA	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO			
	Precipitación con sales	Solventes orgánicos (fenol-cloroformo)	Absorción en columnas de sílice	Unión a esferas magnéticas
Sangre periférica	25-35 µg ADN/ml de sangre	30-70 µg ADN/ml de sangre	25-40 µg ADN/ml de sangre	25-33 µg ADN/ml de sangre
Células	5-7 µg ADN/ 10 ⁶ células	5-10 µg ADN/ 10 ⁶ células	1-5 µg ADN/ 10 ⁶ células	8-16 µg ADN/ 10 ⁶ células
Tejido fresco congelado	± 3,5 µg ADN/ mg de tejido	1-8 µg ADN/ mg de tejido	0,2-1,2 µg ADN/ mg de tejido	2-6 µg ADN/ mg de tejido
Líquido amniótico	1-3 µg ADN/ml de muestra	± 3 µg ADN/ml de muestra	No hay información	0,5-3 µg ADN/ml de muestra

Tejidos embebidos en bloque parafina	$\pm 30 \mu\text{g ADN/ 3 cortes de } 8 \mu\text{m}$	$25\text{-}30 \mu\text{g ADN/ mg de tejido}$	$\pm 37 \mu\text{g ADN/ mg de tejido}$	$\pm 35 \mu\text{g ADN/ mg de tejido}$
---	--	--	--	--

Tabla 6.3 Capacidad de extracción de ADN de los diferentes métodos, modificado de la guía de protocolos utilizados para la extracción de ácidos nucleicos en biobancos, red de biobancos, instituto Carlos III.

6.4.4 Identificación de la muestra

Cada muestra debe estar completa y correctamente identificada, para ellos es importante incluir la mayor cantidad de información tendiente a individualizar esa muestra, para ello se propone la inclusión de datos como:

- Nombre completo y número de documentos de identificación de la persona fuente.
- Fecha de nacimiento
- Tipo de origen del ADN (sangre venosa, hisopado de mucosa, tumores, etc.)
- Identificación de la familia (en casos de estudios genéticos en familias).
- Ubicación en la genealogía
- Diagnostico
- Fecha de toma de la muestra
- Fecha de extracción del material genético ADN/ARN
- Identificación de la persona que procesa la muestra
- Identificación del laboratorio que procesa la muestra

En los casos en los cuales las muestras tengan un propósito de investigación, es pertinente anonimizarlas, esto con el fin de proteger a la persona fuente, para ello es necesario el

establecimiento de códigos los cuales reemplazaran la información personal colectada de la fuente, así como la identificación de la muestra (Lavori et al., 2002), esta codificación permitirá contrastar los resultados de los hallazgos en la investigación, con las características clínicas de la fuente y en llegado caso puede ser beneficiada directamente la persona fuente de la muestra.

6.4.5 Almacenamiento del ADN o la muestra biológica

En el caso que las muestras de ADN no sean utilizadas de forma inmediata, estas pueden ser almacenadas a una temperatura aproximada de -70°C , sin embargo se ha sugerido formas separadas de almacenamiento en alícuotas a diferentes temperaturas 4°C , -20°C y -70° (Madisen, Hoar, Holroyd, Crisp, & Hodes, 1987), es importante mencionar la correcta identificación de cada una de las muestras.

Para el almacenamiento de las muestras de ADN, se han utilizado diferentes recursos, uno de ellos es el nitrógeno líquido, donde se alcanza temperatura hasta -190°C (Mirabet, Alvarez, Solves, Ocete, & Gimeno, 2012).



Imagen 6.1. Contenedor de nitrógeno líquido, permite una temperatura cercana a 190°C bajo cero.

Cortesía del CIGGUR, Bogotá, Colombia.

Otro sistema para el almacenamiento son los congeladores que alcanzan una temperatura constante que puede ir desde los -4°C hasta los -80°C ; de esta forma, se permite el almacenamiento de muestras biológicas por un tiempo casi indeterminado.



A



B

Imagen 6.2. Sistema de almacenamiento en congeladores con temperatura constante, **A.** temperatura a -21°C , **B.** temperatura a -80°C . Cortesía del CIGGUR, Bogotá, Colombia.

Es crucial establecer medios y parámetros precisos para el almacenamiento de las muestras de ADN, con el fin de preservar la calidad del material genético, cualquier fenómeno que modifique las condiciones de almacenamiento puede alterar su calidad, es por ello que fallas en el fluido eléctrico, incendios o eventos sucesivos de congelación-descongelación-congelación, pueden deteriorar la muestra, conduciendo a una probable modificación en el estudio que se realice a partir de ella (Madisen et al., 1987; Yates et al., 1989); además de ello se debe mantener un adecuado control sobre el acceso a las muestras, limitando el número de personal que está en contacto con ellas.

Es necesario tener un registro riguroso de cada muestra, por lo que es pertinente consignar los datos de identificación de la fuente de la misma, datos personales como documento de identificación, fecha de nacimiento, edad en el momento de la toma de la muestra, lugar dentro de la familia, si se trata de un caso familiar debe incluir la identificación de la familia y el diagnóstico (P. A. Roche & Annas, 2006; Yates et al., 1989), otros datos como dirección, teléfono y correo electrónico son igualmente útiles; adicional a estos datos personales se debe registrar la fecha de toma de la muestra. Desde luego todos estos datos deben estar acompañados del consentimiento informado firmado por la persona fuente del ADN.

Como se mencionó con anterioridad de acuerdo al propósito del biobanco, las muestras son sometidas a un análisis particular, por ejemplo identificación forense o detección de una mutación; la figura 6.1, muestra un esquema general del proceso en el banco de ADN, desde el momento de la toma de la muestra hasta la disposición de los resultados por parte del investigador y la forma como se revierten estos resultados a la persona fuente de la muestra

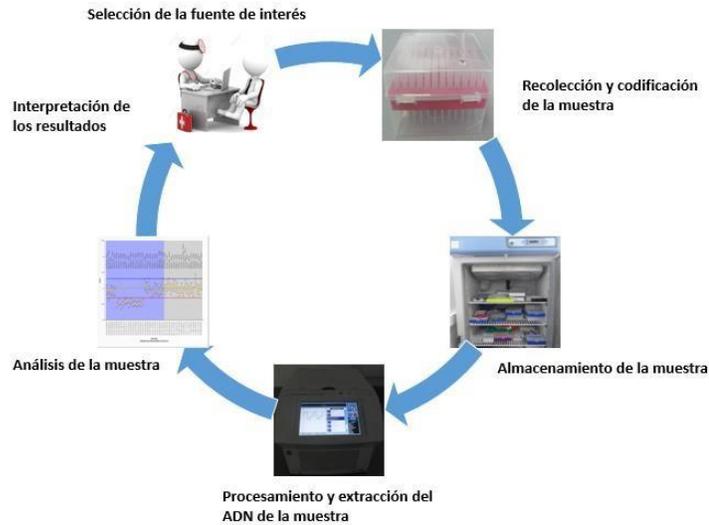


Figura 6.1. Proceso de funcionamiento en un banco de ADN, desde la toma de la muestra, hasta la retroalimentación de los resultados. Modificado de (Lavori et al., 2002).

6.5 Control de calidad en los biobancos y bancos de ADN/ARN

Debido al crecimiento en el número de bancos de ADN/ARN y biobancos y la amplitud de sus propósitos, fue necesario establecer protocolos consensuados entre las diferentes redes de cooperación tanto locales como internacionales, con el fin que proporcionen unos niveles mínimos de calidad; es por este motivo se sugiere la implementación de sistemas de gestión de calidad establecidas por la ISO (*International Standards Organization*) (Otlowski, 2010), en el caso de los bancos de ADN/ARN y los biobancos, se pueden aplicar las normas como:

ISO 9001:2000: especifica los requisitos para un sistema de gestión de calidad permitiendo a una organización mostrar la capacidad de proporcionar de forma coherente productos que satisfagan las necesidades del cliente, aplicando procesos de mejora continua del sistema y el aseguramiento de la conformidad con los requisitos del cliente y los reglamentos aplicables.

ISO/IEC 17025: establece normas generales para la competencia de laboratorios que realizan ensayos y calibración a partir de métodos normalizados, no normalizados y aquellos métodos desarrollados por el mismo laboratorio, procurando garantizar la competencia técnica del laboratorio.

ISO 15189: proporciona los requisitos aplicables a los laboratorio de análisis clínico, relativos a la competencia y la calidad del análisis que son desarrollados con el objeto de brindar información sobre el diagnostico, la prevención o el tratamiento de enfermedades humanas.

ISO 22367: establece parámetros para la reducción del error en el laboratorio medico a través del manejo del riesgo y el mejoramiento continuo

ISO 15194: especifica los requisitos para los materiales de referencia certificados y el contenido de su documentación de apoyo, para que sean considerados de orden metrológico más alto de acuerdo con la norma ISO 17511; esta norma también proporciona los requisitos de como recoger datos para la determinación del valor y como presentar el valor asignado y su incertidumbre de medida.

6.6 Biobancos y bancos de ADN/ARN a nivel mundial

Alrededor del mundo se cuenta con un gran número de bancos de AND/ARN y biobancos, por ejemplo en Europa se encuentran aproximadamente 84, en Norteamérica casi dos centenares de ellos, distribuidos en Canadá con 14 y Estados Unidos con 162, en Asia 21, Australia 14 y finalmente en medio oriente 4 (1 en Irán y 3 en Israel) (www.specimencentral.com); en América latina se cuenta con 19 biobancos especializados en tumores distribuidos así: Chile 5, Argentina 3, puerto rico 2, Brasil, Bolivia, Colombia, México, Perú, Ecuador, Panamá, Uruguay y Venezuela con 1 en cada nación (http://www2.rinc-unasur.org/banco_de_tumores); en la figura 6.2 se da su ubicación geográfica.



Figura 6.2 Distribución mundial de biobancos y bancos de ADN, los números indican la cantidad de biobancos en cada región. Modificado de (C. T. Scott et al., 2012).

Además de los biobancos, en Latinoamérica y España se cuenta con varios bancos de ADN, algunos de ellos, como resultado de la necesidad de establecer una relación de familiares con víctimas de conflictos armados o de otros delitos, se pueden citar casos como el de Argentina con el Banco Nacional de Datos genéticos, impulsado por la sociedad de las abuelas de la plaza de mayo; en España con el proyecto Fénix y el banco de ADN de la Universidad de Barcelona para la identificación de víctimas de la guerra civil; en Colombia donde de forma independiente se han creado varios bancos de ADN con fines de investigación clínica como en la universidad Javeriana o en la Universidad de Antioquia por mencionar algunos (J. cesar Martinez, 2012)

Otro ejemplo es el proporcionado por el banco de ADN para ensayos clínicos auspiciado por el *Department of Veterans Affairs cooperative study* en Estados Unidos, que surge luego de la necesidad de disponer de material genético que pueda ser utilizado en el proyecto de genoma humano (Lavori et al., 2002).

6.7 Conclusión

Como se puede apreciar, los biobancos y los bancos de ADN han alcanzado una amplia diversidad tanto en sus propósitos los cuales fueron inicialmente académicos, para luego, en algunos casos convertirse en propósito de índole económicos, como en la gestión técnica para recolección, el procesamiento y almacenamiento de las muestras, además de ello, la actividad de los biobancos han estimulado la creación de normatividad estatal e internacional, con el fin de regular y estandarizar la forma de recolección de las muestras y de la información proveniente de la persona fuente, como también procurar por la protección de los datos surgidos a partir del material analizado.

En la actualidad además de los biobancos especializados en patologías o condiciones que afectan a los humanos, se cuenta también con biobancos para muestras de origen animal o vegetal, como por ejemplo VetBioBank en Austria, Israel Plant Gene Bank en Israel, o Marine Mammal Tissue Bank y Mouse Stem Cell Bank en Estados Unidos, por mencionar algunos.

Es importante tomar conciencia de la importancia que reviste la necesidad de ampliar la red de biobancos o bancos de ADN en Colombia, esto con el propósito de mejorar la posibilidad de muchos grupos de investigación para tener acceso a muestras biológicas que les permitan satisfacer sus requerimientos; además de ello, el establecimiento de biobancos y bancos de ADN puede contribuir

a ampliar el conocimiento que se tiene sobre la diversidad biológica y genética que tiene la población colombiana, sin dejar a un lado los biobancos de organismos no humanos aprovechando la diversidad en flora y fauna con la que se cuenta en Colombia y que también se beneficiaría de la información recolectada en biobancos específicos para cada uno de ellos.

7. BIOÉTICA EN LAS PRUEBAS DE DIAGNOSTICO, CRIBADO GENETICO Y BIOBANCOS

7.1 Introducción

La palabra ética proviene del vocablo griego *ethos* que significa costumbre; la ética identifica a la ciencia que estudia el comportamiento moral de ser humano, comportamiento que es dependiente del momento de la historia en el que se analiza, es decir en el tiempo en que ocurre y también es influenciado por la región en donde se halla el individuo; por otro, lado la moral es todo comportamiento o norma que es aceptado por una sociedad como válido o correcto; de la misma forma, es esta sociedad la que establece cuales comportamientos son señalados como erróneos o incorrectos.

la bioética es la rama de la ética que tiene como fundamento establecer parámetros para el adecuado comportamiento del humano frente a la vida, este concepto fue utilizado por primera vez en 1927 por el pastor protestante Fritz Jahr (Sass, 2007), quien incluyó este término para describir la relación ética que debe tener el hombre con las plantas y los animales; posteriormente, se refinó este concepto al referirse a la bioética como el estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de la vida y del cuidado de la salud, empleando una variedad de metodologías éticas en un escenario interdisciplinario (Post, 1995).

Finalizada la segunda guerra mundial y luego de que salieran a la luz las múltiples violaciones y excesos a los que fueron sometidos los prisioneros durante los diferentes experimentos médicos, se establecieron tratados con los cuales se estructuró la forma como se deben realizar intervenciones experimentales en humanos (Greek, Pippus, & Hansen, 2012). El código de Núremberg y la declaración de los derechos humanos definen los requerimientos para estas actuaciones, dentro de los cuales, el consentimiento informado, la utilización del método científico

más avanzado, un fin benéfico definido y la evaluación del riesgo/beneficio deben ser contemplados en cada proyecto de investigación.

Tratados e informes posteriores, como el informe Belmont, ampliaron las normas éticas para la realización de intervenciones en humanos (T. Beauchamp, 2008; National Institutes of Health, 1979); sin embargo, solo hasta 1979, Beauchamp y Childress establecieron los cuatro principios básicos de la bioética: autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia (Beauchamp and Childress, 2001), los cuales se describen a continuación:

7.2 Principios de la bioética

Principio de la autonomía: se refiere a la capacidad que tiene cada individuo para auto-gobernarse, es decir, la capacidad de tomar sus propias decisiones de forma libre. Para Beauchamp y Childress una persona toma una decisión autónoma cuando lo hace con intención, con comprensión y sin influencias que determinen su acción; esta autonomía se puede lograr cuando el profesional médico revela la información al paciente, se asegura que se haya comprendido y facilita que él tome la decisión de acuerdo a los valores y creencias personales presentes en el paciente.

Principio de la beneficencia: toda acción realizada durante la atención de un paciente debe ser encaminada en pro de mejorar su estado de salud; para ello el profesional debe hacer un balance entre el beneficio y el riesgo de realizar una intervención determinada, antes de tomar una decisión.

Principio de la no maleficencia: a diferencia de la beneficencia, donde se realizan acciones tendientes a favorecer al paciente, la no maleficencia procura evitar realizar acciones que puedan ocasionar daño al paciente; este daño puede presentarse como dolor o discapacidad y, es claro que no se puede excluir los daños mentales que pueda sufrir una persona y desde luego las acciones que le causen la muerte o que aumenten el riesgo de llegar a ella.

Principio de justicia: se entiende como el trato equitativo y apropiado de lo que es debido a una persona, en referencia a la distribución imparcial, equitativa y apropiada de los recursos propios de la sociedad, todo esto enmarcado en normas que estructuran los términos de cooperación social.

7.3 Aplicación de los principios de bioética.

A partir de estos fundamentos la bioética amplía sus horizontes de intervención que partían de la investigación biomédica a campos como la atención clínica, las pruebas diagnósticas, así como los problemas sociales y políticos que tengan injerencia directa en la relación hombre-vida (Vevaina, Nora, & Bone, 1993).

Como es el propósito de este escrito, se hablará de la bioética en las pruebas diagnósticas genéticas, teniendo en cuenta el constante crecimiento que han tenido las mismas, así como el profundo impacto que pueda generar tanto en el individuo afectado como en su entorno familiar. Para cumplir con este propósito, se hace necesario verificar el cumplimiento de los principios de la bioética como parte del proceso de diagnóstico de pacientes con patologías genéticas.

Como primera instancia es necesario identificar los problemas que desde el punto de vista ético puedan estar involucrados durante el proceso de diagnóstico genético.

El primer paso en la realización de la prueba genética es identificar el objetivo de la misma; en el ámbito clínico, esta función es realizada por el médico genetista (Evans, Bergum, Bamforth, & MacPhail, 2004), durante esta primera aproximación se presenta el primer reto ético, que es la posibilidad de acceso a este tipo de pruebas, el cual está en relación con el principio de justicia, teniendo en cuenta que el paciente tiene el derecho de conocer cuál es la causa que origina su condición.

En este primer aspecto, la legislación colombiana ha promulgado la ley 1392 del 2010, a través de la cual se reconocen las enfermedades huérfanas y se adoptan normas tendientes a garantizar la protección social por parte del estado colombiano, de esta manera en el artículo primero y sexto de dicha Ley establecen entre otros la accesibilidad en la fase de diagnóstico y el deber del gobierno nacional para establecer guías de atención, procedimientos diagnósticos y tratamiento para este grupo de población especial (Republica de Colombia & Social, 2010).

Luego de establecer el tipo de prueba a realizar, se debe procurar obtener autorización por parte del paciente para la realización de la prueba, esto estará protocolizado a través del consentimiento informado por medio del cual se busca brindar protección a otros principios bioéticos, que serán expuestos más adelante.

7.4 Consentimiento informado

El consentimiento informado se introdujo en 1970 y hace parte de un concepto que se desarrolla de forma paralela con la bioética, el cual está fundamentado desde el punto médico, filosófico, investigativo y legal, como el acto concertado entre el médico y el paciente, donde el primero proporciona una información de calidad sobre el procedimiento que se va a realizar y, el paciente, basado en la comprensión sobre esa información, autoriza o rechaza tal intervención (T. L. Beauchamp, 2011).

De forma general se puede decir que el consentimiento informado consta de dos partes, la primera hace referencia a la información que se debe brindar al paciente, la cual debe ser clara, oportuna, veraz, suficiente y objetiva, asegurándose durante este paso, que la persona involucrada haya entendido adecuadamente el proceso, conociendo los beneficios y las complicaciones que puede presentar durante el mismo, y permitiendo que sean realizadas preguntas respecto al

procedimiento, ofreciendo respuestas claras a cada uno de los interrogantes; de esta forma se busca satisfacer los principios de beneficencia y no maleficencia.

La segunda parte del consentimiento informado hace referencia a la libertad de elección, que será ejercida por el paciente cuando brinde o no su autorización para la realización de la prueba; de esta forma busca proteger el principio de autonomía a la que el paciente tiene derecho.

7.4.1 Elementos de Información en el Consentimiento Informado

Partiendo de los cuatro principios propuestos por Beauchamp y Childress, se debe procurar el cumplimiento de cada uno de ellos y la protección del paciente, es por esto que durante el proceso donde se construye el consentimiento informado, se sugiere la realización de una lista de chequeo, la cual debe contener los puntos indicados en la tabla 7.1, que originalmente fueron propuestos para la realización del consentimiento informado para la secuenciación de genoma completo, pero que pueden ser adaptados a cualquier otra prueba diagnóstica en genética.

Elemento	Principio
Alcance de la prueba	beneficencia
Descripción de la prueba	Beneficencia
Beneficios que se espera	beneficencia
Desventajas	No maleficencia
Voluntad de realización de la prueba	autonomía
Posibilidad de retiro sin consecuencias	No maleficencia
Métodos alternativos	No maleficencia
Medidas para asegurar la confidencialidad	Justicia
Destino de las muestras luego de finalizar la prueba	Autonomía

Tabla 7.1 Lista de chequeo del consentimiento informado. Modificado de (Ayuso, Millán, Mancheño, & Dal-Ré, 2013).

En Colombia la resolución 8430 de 1993 por el cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, en su artículo 15 establece que: “el consentimiento informado deberá presentar la siguiente información, la cual será explicada en forma completa....., en tal forma que pueda comprenderla. a) la justificación y los objetivos de la investigación, b) los procedimientos que van a usarse y su propósito incluyendo la identificación de aquellos que son experimentales, c) las molestias o riesgos esperados, d) los beneficios que puedan obtenerse, e) los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto, f) la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto, g) libertad para retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento, h) la seguridad que no se identificara al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad, i) el compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando, j) la disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho, por parte de la institución responsable de la investigación, en caso de daños que le afecten directamente, causados por la investigación, y k) en caso de que existan gastos adicionales, estos serán cubiertos por el presupuesto de la investigación o de la institución responsable de la misma” (Ministerio de Salud y Protección Social, 1993).

Adicionalmente se debe desglosar cada uno de los siguientes aspectos, los cuales se considera deben ser tratados y consignados en un formato escrito que debe ser leído y comprendido por parte del paciente, previo a dar su autorización para realizar un procedimiento.

- Título: en él se debe mencionar el nombre de la prueba que va a ser realizada, el nombre de la institución o laboratorio a cargo de su proceso, así como su ubicación.
- Muestra que va a ser analizada: indica el tipo de muestra que es recolectada para el respectivo análisis genético, describe forma para ser obtenida, tipo de recipiente para ser contenida, forma de almacenamiento y transporte.
- Descripción de la prueba: se hace una descripción del tipo de análisis genético al cual va a ser sometida la muestra genética, lugar donde va a ser realizada y forma de almacenamiento
- Privacidad: se hace una relación de las personas que están autorizadas para tener acceso a las muestras y los resultados, procurando un estricto control de la información proporcionada por el paciente, como la información que se produce durante la prueba.
- Complicaciones: se indican las posibles complicaciones que se puedan presentar durante el desarrollo de la prueba.
- Resultados: indaga sobre el deseo de conocer resultados inesperados o incidentales durante el análisis de la prueba y que no están relacionados directamente con el objetivo del examen.
- Lugar de almacenamiento: indica el sitio de almacenamiento del material genético restante luego de realizar la prueba genética, en algunas oportunidades se indica en este punto si la persona fuente desea que este material sea desechado.

- Utilización de la muestra para otros fines: este punto tiene como propósito determinar la posibilidad de incluir el material genético obtenido. en estudios de investigación que estén en curso o que puedan iniciar con posterioridad.
- Información de los resultados: se pregunta sobre la posibilidad que los resultados de las pruebas puedan ser conocidas por una persona elegida por el paciente, o si por el contrario se deja establecido que solo el paciente tendrá acceso al resultado de estas.
- Firma del consentimiento informado: el paciente da su autorización para la toma de la muestra y el análisis genético de la misma.

7.5 Competencia para la firma del consentimiento informado

Es importante recalcar que este proceso debe ser realizado con personas competentes en términos legales (edad) y capacidad mental.

En Colombia estas características están determinadas por el código civil, título II: De los actos y declaraciones de voluntad, artículo 1503: “todas las personas son consideradas legalmente capaces, excepto aquellas que la ley declare incapaces”, a continuación el artículo 1504 describe quienes son considerados incapaces, “son absolutamente incapaces los dementes, los impúberes y sordomudos que no puedan darse a entender. Sus actos no producen ni aun obligaciones naturales y no admiten caución. Son también incapaces los menores adultos que no han obtenido habilitación de edad y los disipadores que se hallen bajo interdicción; pero la incapacidad de estas personas no es absoluta, y sus actos pueden tener valor en ciertas circunstancias y bajo ciertos respectos determinados por las leyes” (Republica de Colombia, 2000).

7.5.1 Consentimiento Informado para menores de edad

De acuerdo con la legislación colombiana, el código de infancia y adolescencia ley 1098 de 2006, señala en su artículo 3 define como “niño o niña las personas entre los 0 y los 12 años, y adolescentes a las personas entre los 12 y los 18 años” (Ministerio de la Protección Social, 2006); así mismo el código civil en el capítulo V Definiciones de varias palabras de uso frecuente, artículo 34 “llámese infante o niño, todo aquel que no ha cumplido siete años; impúber, el varón que no ha cumplido catorce años y la mujer que no ha cumplido doce años...” (Colombia. Congreso de la República, 2013).

La realización de una prueba genética a un menor de edad, tiene implicaciones no solo en la salud presente de un niño sino también las futuras alteraciones a la salud de este niño, no solo desde el punto de vista físico, también el estado anímico, su autoestima puede verse alterada, debido al potencial riesgo de estigmatización, el cambio de estilo de vida y desde luego las preocupaciones propias del niño respecto a su estado de salud (Taruscio, 2000; Tozzo, Caenazzo, & Rodriguez, 2012).

Cuando se habla de pruebas genéticas para un menor de edad, algunas guías dividen estas pruebas en varios grupos, como son las pruebas de cribado, las pruebas diagnósticas, pruebas de portador y pruebas de histocompatibilidad; en cada una de ellas existen requerimientos e indicaciones que deben ser cumplidos (Ross et al, Ross, Saal, David, & Anderson, 2013), uno de ellos es contar con el consentimiento para su realización, en el caso de los menores de edad, como es conocido, son los padres o tutores legales los responsables de ellos y por tanto tiene la autoridad de hablar a su nombre y desde luego tomar decisiones por ellos, procurando “el beneficio para el niño” (Elger, 2010), el cual puede estar dado por la posibilidad de tener una intervención terapéutica o preventiva precoz (Ross et al et al., 2013)

La autonomía que tienen los padres para aceptar la realización de una prueba genética comienza a ser menor, cuando los niños empiezan a tener conciencia de su entorno, ampliando su capacidad intelectual y psicosocial, permitiendo que él mismo pueda tomar sus propias decisiones; esta capacidad no depende enteramente de la edad, sin embargo se encuentra que algunos niños alcanzan esta habilidad entre los 12 a 14 años de edad -denominados en algunas oportunidades como menor adulto- (Phadke & Gowda, 2013), de esta manera el menor se hace partícipe de la decisión, indicando si está de acuerdo o no con la realización de la prueba genética.

Teniendo en cuenta este último aspecto, la figura del asentimiento informado toma fuerza, como documento de soporte para fomentar el respeto por la autonomía y libre expresión del menor adulto, dándole una connotación de índole moral, más que jurídica, cuando es realizado en el escenario diagnóstico; sin embargo el carácter jurídico del asentimiento es absoluto cuando se utiliza en el ámbito investigativo (B. Pinto & Gulfo, 2013).

La opinión del menor se hace más relevante cuando son realizadas pruebas de tipo predictivo o pre sintomático, debido al cambio que pueda ejercer el resultado en su estilo de vida, teniendo en cuenta esto, algunas guías recomiendan que las pruebas deban retrasarse hasta que el joven pueda decidir por sí mismo en que momento y si desea que se realice la prueba (British Society of Human Genetics, 2010).

7.5.2 Consentimiento informado para mayores de edad

En el caso de los adultos, el consentimiento informado será estructurado de acuerdo a las recomendaciones indicadas previamente y la decisión estará sujeta a la voluntad del paciente, salvo las excepciones que se contemplan como es el caso de aquellas personas que tienen limitaciones cognitivas.

A continuación en la tabla 7.2, se hace una aproximación de como el consentimiento informado brinda garantías para el cumplimiento y la protección de los principios éticos propuestos por Beauchamp y Childress, cuando este proceso inicial es llevado de acuerdo con las condiciones descritas en la lista de chequeo.

Principios éticos	Condición para su observancia	Garantías para cumplirlos
No maleficencia y Beneficencia	Validez analítica de la prueba genética. Validez clínica de la prueba genética Utilidad clínica de la prueba	La solicitud de la prueba genética debe ser realizada por un profesional cualificado, que tenga claro el significado y las posibles implicaciones de los resultados, así como las necesidades de asesoramiento genético.
Autonomía	La realización de la prueba debe ser de forma voluntaria	El acceso a la información pertinente sobre el propósito de la prueba, el significado de los resultados, los riesgos y beneficios de la misma, brindan herramientas al paciente para determinar si se somete a esta. De la misma forma esta información facilita que los custodios o representantes legales de un paciente que no está en capacidad de decidir, den su aval para la realización.
Equidad y justicia	Todos los individuos han de tener un acceso equitativo a las pruebas genéticas y a la asesoría genética que este requiera	Planificación de los recursos necesarios, así como brindar educación al público sobre la disponibilidad de los servicios de genética y el impacto de la información derivado de los resultados de las pruebas

Tabla 7.2. Cobertura de los principios éticos por parte del consentimiento informado. Modificado de (Pampols et al., 2013)

7.6 Protección de los datos genéticos

La prueba diagnóstica presentara un resultado el cual contiene información relacionada directamente con las características hereditarias del paciente, que sumada con la información obtenida durante el proceso inicial de identificación (por ejemplo: genealogía), son denominados en conjunto *Datos Genéticos*.

Los datos genéticos han sido definidos por la Declaración Internación de Datos Genéticos Humanos en su artículo 2 como “toda información sobre las características hereditarias de las personas, obtenidas por análisis de ácidos nucleicos u otros análisis científicos” (UNESCO, 2003); así mismo el consejo europeo de ministros lo define como “todos los datos, con independencia de su tipo, que se refieren a las características de una persona o al modelo de herencia de estas características dentro de un grupo de personas que pertenezcan a la misma familia” (http://ec.europa.eu/justice/policies/privacy/docs/wpdocs/2004/wp91_es.pdf).

A partir de estos conceptos es importante establecer directrices encaminadas a la protección de todos los datos obtenidos por este medio, dado que de no cumplirse un adecuado protocolo que garantice la protección de esta información, la persona “propietaria” de estos datos puede verse afectada al ser invadida su intimidad.

De la misma forma que una persona puede ser afectada en su intimidad por un inadecuado manejo de sus datos personales y en este caso de sus datos genéticos, es necesario indicar que otros derechos pueden ser vulnerados, dentro de estos se tiene:

- El derecho de autodeterminación física: libertad decisoria que tiene cada individuo para optar o seleccionar que hacer o no, respecto a situaciones que afecten su realidad física o su sustrato corporal (Gómez Sánchez, 2011)

- El derecho de autodeterminación informativa: facultad de toda persona para ejercer control sobre su información personal, que pueda estar contenida en registros públicos o privado (Sánchez, 2008)
- El derecho a la identidad genética: conocimiento de su patrimonio biológico o su configuración genética (Escajedo & Epifanio, 2013)
- El derecho a la igualdad.
- El derecho a no ser discriminado ni estigmatizado.

En Colombia, la ley 1.581 de 2012, por la cual dicta disposiciones generales para la protección de datos personales, establece en el título III, artículo 5 que son datos sensibles: “aquellos que afecten la intimidad del titular o cuyo uso indebido puede dar lugar a discriminación tales como aquellos que revelen origen racial o étnico, orientación política, convicciones religiosas o filosóficas, la pertenencia a sindicatos, organizaciones sociales, de derechos humanos o que promuevan interés de cualquier partido político o que garanticen los derechos y garantías de partidos políticos de oposición, así como los datos relativos a la salud, a la vida sexual y los datos biométricos” (Colombia. Congreso de la República, 2012)

Así mismo en el artículo 6 del mismo título “se prohíbe el tratamiento de datos sensibles”, exceptuando cuando el tratamiento tenga fines “históricos, estadísticos o científicos”, en cuyo caso se “deberán adoptar las medidas conducentes a la supresión de la identidad de los titulares”, el artículo 12 hace referencia a la información que debe ser suministrada al titular de los datos por parte de la persona que va a realizar un tratamiento (manipulación) de su información, entre la información que debe ser suministrada se encuentra: 1. El tratamiento al cual serán sometidos sus datos y la finalidad del mismo, 2. Los derechos que le asisten como titular, 3. Identificación, dirección física o electrónica y teléfono del responsable del tratamiento.

Sin embargo aunque no es claramente explícita la ley en lo referente a datos genéticos, se puede considerar la información conseguida durante el proceso diagnóstico como un dato sensible, que para efectos prácticos puede ser cobijado por esta norma.

7.7 Resultados de la prueba diagnóstica

Luego del procesamiento de la muestra se obtiene un resultado, el cual puede estar enmarcado en uno de tres escenarios posibles, los cuales pueden ser un resultado positivo, un resultado negativo, y un resultado con hallazgos indeterminados, en cada uno de estos casos se deben tomar medidas no solo desde el punto de vista clínico como por ejemplo inicio de tratamiento, realización de intervenciones quirúrgicas, entre otros, sino también las decisiones que deben ser tomadas desde el punto de vista ético, como por ejemplo informar o no a otros miembros de la familia, tomar decisiones reproductivas, terminación voluntaria del embarazo etc.

7.7.1 Resultado positivo

A partir de los tres escenarios del resultado de la prueba, al establecerse un diagnóstico positivo, la información debe ser comunicada al paciente, sin embargo es necesario tener en cuenta las implicaciones del resultado, desde el punto de vista personal, social, familiar; un resultado positivo para una enfermedad genética puede generar estrés psicológico, discriminación, e incertidumbre sobre el futuro y la posibilidad de tratamiento (Burgess, 2001), por esta razón el proceso debe estar enmarcado en una adecuada asesoría genética brindada por un profesional entrenado para tal fin.

7.7.2 Resultado negativo

De la misma forma que se brinda una orientación cuando el resultado de la prueba es positivo, es importante brindar un acompañamiento y asesoría cuando el resultado es negativo, si bien es cierto el resultado negativo puede descartar la presencia de una condición particular, en otras oportunidades es necesario continuar indagando para tratar de establecer cuál puede ser el posible origen de esta condición, en este caso, la prueba genética no es concluyente, este aspecto es relevante tenerlo en cuenta, dada la posibilidad que la alteración genética causal requiera para su detección un tipo de prueba diferente a la ya realizada.

7.7.3 Hallazgos indeterminados/incidentales o secundarios

Los hallazgos incidentales, son definidos como la identificación de alteraciones adicionales que no necesariamente están relacionadas con la búsqueda de causas primarias en patología estudiada; sin embargo en la actualidad se está utilizando el término “secundario”, para referirse a los resultados que no están relacionados con la indicación diagnóstica de la prueba (M. I. Roche & Berg, 2015); estos hallazgos presentan un gran reto, no solo médico, sino también ético.

El primer aspecto para tenerse en cuenta es la voluntad expresa del paciente, en conocer o no los hallazgos secundarios, esto está basado en el derecho que tiene el paciente a no saber (Andorno, 2004); esta decisión debe estar consignada en el cuerpo del consentimiento informado y, como principal requerimiento, el paciente debe tener una clara comprensión de las implicaciones que pueden tener los hallazgos secundarios (M. I. Roche & Berg, 2015).

El segundo aspecto a tener en cuenta frente a un hallazgo secundario es determinar si éste es medicamente accionable o no accionable, entendiéndose un hallazgo secundario medicamente accionable como “la variante patológica o probablemente patológica que confiere una alta

probabilidad de enfermedad, para la cual el conocimiento de su presencia permite intervenciones médicas que puedan significativamente reducir la morbilidad y mortalidad” (Berg et al., 2013).

Partiendo de este último aspecto la ACMG (*American College of Medical Genetics*), estableció un grupo de trabajo sobre hallazgos secundarios, este grupo propuso en el año 2013 una lista de 56 genes para los cuales es indicación reportar los hallazgos secundario (Green, Berg, Grody, Kalia, Korf, Martin, McGuire, Nussbaum, O’Daniel, Ormond, Rehm, Watson, Williams, Biesecker, et al., 2013; Kalia et al., 2017), debido a que estos hallazgos pueden ser medicamente accionables, teniendo en cuenta que se espera que aproximadamente el 2% de los evaluados puedan presentar una hallazgo secundario medicamente accionable (Amendola et al., 2015).

De acuerdo a las recomendaciones de ACMG, la forma de cómo, cuándo y si se comunican los resultados, debe estar determinado por el juicio médico, el cual debe estar centrado en el paciente, además de tener en cuenta que esta decisión puede afectar otras áreas de la atención médica (McGuire, McCullough, & Evans, 2013).

7.8 Asesoría genética como medio de protección para el paciente

En varios países de Europa y en los Estados Unidos de América, se ha desarrollado la consejería genética como un medio para manejar la complejidad de la información suministrada, así como plataforma para encaminar un proceso de orientación al paciente y su familia sobre el curso de la enfermedad, posibilidades terapéuticas, pronóstico y riesgos inherentes a la enfermedad (Biesecker, 2001); de esta forma se puede articular un manejo multidisciplinario, con el fin de dar soporte profesional a todos los requerimientos del paciente y su familia.

La asesoría genética o consejo genético es un proceso de comunicación en el cual se ayuda a los pacientes y a sus familias a comprender y adaptarse a las implicaciones médicas, sociales y familiares que sobrevienen de un trastorno genético (Galan Gomez, 2010).

7.9 Etapas del asesoramiento genético

El proceso de asesoramiento genético puede dividirse en las siguientes etapas:

- Recolección de la información.
- Definición del diagnóstico y evaluación del riesgo.
- Realización del estudio genético e interpretación de los resultados.
- Recomendaciones de seguimiento y tratamiento.
- Contacto y actualización.

Es importante mencionar que el asesoramiento es un proceso no dirigido, es decir, pretende brindar la información suficiente para que el mismo paciente sea quien tome la decisión, respetando su autonomía, no solo con respecto a la realización de una prueba genética, sino también para la realización de un tratamiento específico y en muchos casos para definir su vida reproductiva.

7.10 Retos éticos luego de conocer el resultado de la prueba genética

El proceso que involucra la realización de una prueba genética culmina con la información de un resultado, el cual les permite tanto al profesional de la salud como al paciente, tomar una decisión respecto a la forma de manejo de la enfermedad, que en muchos casos está relacionado con el tipo de tratamiento a seguir, por ejemplo si el manejo es quirúrgico, farmacológico o expectante.

Así mismo, surgen otros retos éticos que deben ser tratados de una forma multidisciplinaria, debido a la dificultad que revisten para el manejo y a la posibilidad de involucrar a terceros, sean estos enfermos, asintomáticos, portadores o sanos. A continuación se mencionan algunos de ellos, si bien no se tratan a fondo dada la complejidad y particularidad de muchas patologías, se mencionan para que sean tenidos en cuenta, principalmente por los profesionales tratantes.

7.10.1 El derecho de terceros

El primero de los retos es el derecho de terceros a tener conocimiento del resultado de la prueba genética, los cuales pueden verse beneficiados por el conocimiento que se derive de dicha prueba, como el caso de hermanos o hijos del paciente, el secreto profesional al que están sometidos los profesionales de la salud propone una limitación desde el punto de vista legal y ético a este derecho; sin embargo, se considera que hay excepción al deber secreto cuando se busca evitar 1. Daño a persona ajena, 2. Daño a persona propia y 3. Por imperativo legal (Júdez et al., 2002) condiciones que están dispuestas en el artículo 38 de la ley 23 de 1981.

7.10.2 El derecho a decidir una vida reproductiva

Por otro lado, se encuentra el derecho a tomar decisiones respecto a la vida reproductiva y la forma como puede satisfacer su deseo de paternidad/maternidad. Teniendo en cuenta las diferentes opciones que se brindan en la actualidad, como por ejemplo la donación de gametos (ovulo/espermatozoide), la fertilización *in vitro* con diagnóstico preimplantacional, la donación de un embrión o la adopción.

7.10.3 Reto sobre decisiones eugenésicas

Finalmente, el resultado de algunas pruebas genéticas como por ejemplo las realizadas en el periodo prenatal, puede dar lugar a que se tomen decisiones que puedan ser interpretadas como

eugenésicas, este es el caso de la Interrupción Voluntaria del Embarazo (IVE), la cual fue despenalizada en el 2006 a través de la sentencia c355 de la Corte Constitucional de Colombia (Nacional, 2007). La IVE tiene indicaciones claras para que pueda ser realizada, estas son:

- Peligro para la vida o salud de la mujer.
- Cuando exista grave malformación del feto que haga inviable su vida.
- Cuando el embarazo sea resultado de cualquier forma de abuso sexual o de inseminación o transferencia de ovulo fecundado no consentido o de incesto.

Las dos primeras indicaciones son las que más se pueden relacionar con los métodos diagnósticos genéticos, en primer lugar se debe tener una claridad del concepto de salud, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS): “la salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades” (Organización Mundial de la Salud, 2006); por lo tanto, ante un resultado adverso en una prueba genética prenatal, puede verse alterada la salud en este caso mental de la gestante, que la puede llevar a tomar una decisión frente a su estado gestacional.

En el caso de la segunda indicación, es clara la relación directa entre el resultado confirmatorio de una enfermedad genética y la posibilidad que esta alteración desencadene una condición que comprometa la viabilidad fetal; sin embargo, es importante que ante la presencia de un resultado anormal, la gestante tenga una adecuada orientación respecto al tipo de diagnóstico que se realiza, así como las consecuencias y los posibles soportes terapéuticos.

Como se puede apreciar este último aspecto reviste una gran complejidad, por encontrarse en un punto donde convergen tanto el derecho de la gestante a conservar su salud, como los posibles derechos del no nacido a la vida, por esta razón se insiste en la necesidad de realizar un manejo interdisciplinario con el propósito de asesorar de forma adecuada la toma de decisiones.

7.11 Conclusión

Las pruebas genéticas pueden contribuir a dar una explicación de las causas de una enfermedad genética, facilitan el establecimiento de un plan de tratamiento de acuerdo al pronóstico de las alteraciones identificadas y contribuyen con la identificación de susceptibilidades o niveles de riesgo en otras patologías, como es el caso de las pruebas de cribado; de esta forma, el personal de salud y la familia pueden implementar acciones tendientes por ejemplo a disminuir las complicaciones derivadas de estas enfermedades.

Sin embargo, para llegar a este punto, además de los requisitos técnicos y tecnológicos propios de una prueba, es necesario cumplir con varias premisas, las cuales tienen como común denominador la protección del participante en la prueba genética que surgen de normas internacionales como el código de Núremberg, la declaración de los derechos humanos y el informe de Belmont, los cuales se suman a directrices que debe estar presentes en el comportamiento de los profesionales que realizan la prueba y que se reúnen en los cuatro principios de bioética de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia, pero que han evolucionado para incluir otros principios y derechos como la autodeterminación, la identidad genética y la protección de datos genéticos.

Estas directrices obligan a establecer una serie de normas que permiten su aplicación, como ejemplo se puede citar la ley a través de la cual se reconocen las enfermedades huérfanas y otras tendientes a proteger la información obtenida durante todo el proceso para la realización de la prueba genética, como fue establecido por la Declaración Internacional de Datos Genéticos Humanos. Esta estrecha relación entre las normas bioéticas y las normas legales, hace que la trasgresión de alguna de estas normas, genere una sanción que no solo tiene un carácter moral, sino también de tipo penal, por lo cual es importante tener en cuenta la normatividad relativa a las pruebas genéticas

con el fin de proporcionar un escenario ética y legalmente apropiado, que le brinde una adecuada protección al paciente.

8. FUTURO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN GENÉTICA

En los capítulos precedentes se mostró una diversidad de pruebas genéticas que están disponibles y que sirven para el diagnóstico de varios miles de padecimientos, enfermedades, síndromes y otras alteraciones (<http://www.omim.org/statistics/entry>). A continuación se hará un resumen de los diferentes métodos, técnicas y equipos de laboratorio que han contribuido con la identificación causal de un número creciente de padecimientos genéticos en el ser humano, partiendo del microscopio y su aporte a la citogenética, pasando por pruebas imagenológicas, bioquímicas, de hemoaglutinación (hematológicas); la adición de métodos como la electroforesis, la optimización de técnicas para el cultivo celular y más recientemente el análisis de ADN y de mecanismos que regulan o modifican la expresión del genoma (epigenómica).

8.1. Microscopio de luz y pruebas citogenéticas.

Uno de los principales hitos en genética comenzó en la era pre-mendeliana (siglo XVII), con la invención del microscopio, cuando por vez primera se pudieron observar las células de diferentes organismos (parásitos, por ejemplo) y tejidos. Si bien se había establecido de manera incorrecta el número de cromosomas humanos desde los inicios del siglo XX, gracias al microscopio, a la disponibilidad del cultivo celular y al uso de la solución hipotónica, en 1956, fue posible establecer el número correcto y realizar el diagnóstico de alteraciones cromosómicas, el cual se inició en 1959 mediante el cariotipo, iniciándose la edad de la citogenética (Amos, 2000). Si bien se le atribuyó a Jerome Lejeune el crédito del descubrimiento de la Trisomía 21, este parece corresponder también a los doctores Gauthier y Turpin, ambos franceses (Rivera, 2016).

El auge de la citogenética se debió a la innovación de nuevas formas de cultivo celular, de variaciones en los métodos para la obtención, fijación y tinción de los cromosomas (Rodríguez-Hernandez et al., 2014), como también las mejoras realizadas al microscopio, estos cambios ampliaron la resolución (alta resolución), o el realce de zonas específicas de los cromosomas (FISH) (Bauman et al., 1981).



Imagen 8.1. Microscopio óptico, herramienta de análisis en citogenética convencional. Cortesía de la bióloga Jackeline Agudelo, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

Luego del descubrimiento de la Trisomía 21 y seguidamente de las demás trisomías y monosomías viables, en ese entonces a todos los afectados por una enfermedad de causa desconocida o de probable etiología genética, se les solicitaba un cariotipo. Así se comenzaron a identificar un número importante de entidades cromosómicas que tenían aneuploidías (trisomías y monosomías) o alteraciones estructurales de los cromosomas, no solo en tejidos como la sangre venosa o

fibroblastos de la piel, sino también en la medula ósea, en restos ovulares, en leucemias, linfomas y en tejidos sólidos (principalmente tumores).



Imagen 8.2. Visualización bajo microscopio óptico de un set de cromosomas, aumento 100X.

Cortesía del biólogo Esteban Medina, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia

8.2. Pruebas imagenológicas

Otro de los métodos de diagnóstico que también ha aportado desde hace tiempo al diagnóstico genético son los rayos X, que fueron descubiertos a finales del siglo XIX y permitieron identificar las alteraciones óseas relacionadas con las displasias esqueléticas, las alteraciones del crecimiento (European Society of Radiology, 2012). Por otro lado la difracción de los rayos X se utilizó para dilucidar la estructura del ADN en 1953 (McGregor & Gunderman, 2011); la aparición de nuevos

tipos de imágenes diagnósticas ha permitido la identificación de diferentes alteraciones morfológicas, congénitas o posnatales, que son el resultado de alteraciones genéticas basales.

El ultrasonido, por ejemplo, se implementó a partir de 1969 como herramienta para el cribado de desórdenes anatómicos fetales y cromosómicos (Campbell, 1969), herramienta que progresivamente se ha complementado con marcadores bioquímicos como PAPP-A, β -HCG, E3, α -feto proteína e Inhibina A, para aumentar su precisión en la identificación de estos desordenes (Dey et al., 2013).

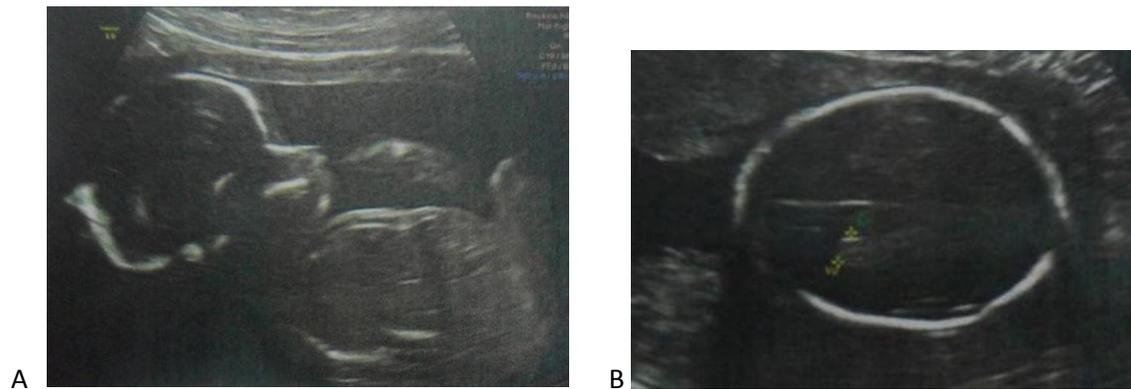


Imagen 8.3. Ultrasonografía en dos dimensiones utilizada en las primeras etapas de cribado neonatal.

Además de los métodos imagenológicos antes mencionados, se puede sumar otros, dentro de los cuales se incluyen: la Resonancia Magnética Nuclear –RMN-, que ha contribuido al diagnóstico y principalmente al seguimiento en algunas patologías genéticas que cursan con tumoraciones benignas, pero que su presencia puede alterar el funcionamiento de órganos vecinos al tumor (Raus, Coroiu, & Capusan, 2016); la tomografía con emisión de positrones (*Positron Emission Tomography* –

PET-) utilizada entre otras aplicaciones para la diferenciación entre hiperinsulinismo congénito focal y el hiperinsulinismo congénito difuso (Mohnike et al., 2008).

finalmente en la primera década del siglo XXI, dos métodos imagenológicos han ampliado a un más el horizonte diagnóstico en enfermedades genéticas, el primero de ellos es la resonancia magnética nuclear con espectroscopia la cual ha mostrado su aplicabilidad como complemento diagnóstico en enfermedades mitocondriales, al permitir la medición de la actividad metabólica en el cerebro (L. García, Guglielmo, & Illa, 2010); y el segundo método son las Imágenes Moleculares (gammagrafía), este último método permite la visualización en tiempo real de eventos bioquímicos, interacción proteína-proteína, y conversión enzimática, permitiéndole una gran variedad de aplicaciones como por ejemplo en neurociencias, enfermedades cardiovasculares o en genética (James & Gambhir, 2012).

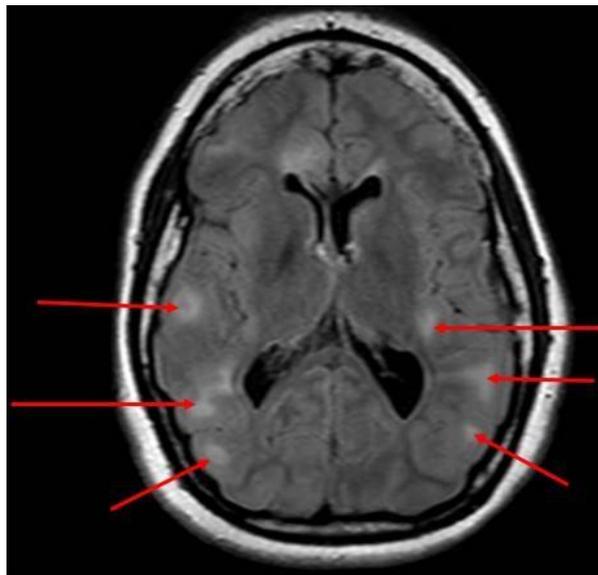


Imagen 8.4. RMN que permite visualizar la presencia varios tubérculos corticales (flechas rojas) los cuales hacen parte del diagnóstico de esclerosis tuberosa. Cortesía de la doctora Juliana Vargas, INNN Manuel Velazco, Ciudad de México, México.

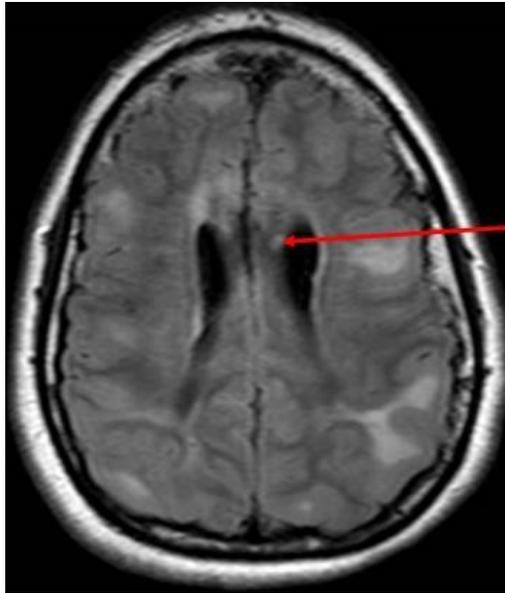


Imagen 8.5. Tubérculo subependimario (flecha roja) visualizado a través de RMN. Cortesía de la doctora Juliana Vargas, INNN Manuel Velazco, Ciudad de México, México.

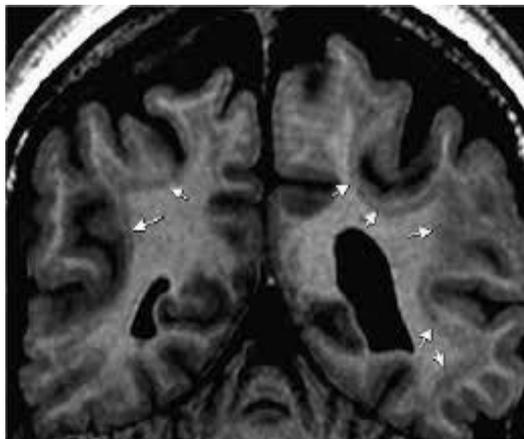


Imagen 8.6. RMN que muestra imagen de doble corteza, la cual es una heterotopia por mutación en el gen *DCX*, que se asocia a epilepsia. Cortesía de la doctora Juliana Vargas Osorio, INNN Manuel Velazco, Ciudad de México, México.

8.3. Pruebas bioquímicas y sanguíneas.

Las pruebas bioquímicas, al igual que las imágenes diagnósticas, proporcionan una visión indirecta de alteraciones genéticas al identificar un metabolito que normalmente no está presente en un tejido determinado o que está presente cuando éste no lo debe estar. A comienzos del siglo XX se desarrollaron pruebas para el análisis de metabolitos (pruebas de tubo de ensayo), que permitieron identificar algunos errores innatos del metabolismo (Barrera Avellaneda, 2009).

Por la misma época, se introdujeron formas para identificar los diversos grupos sanguíneos a través de reacciones hematológicas que utilizaban la hemaglutinación (reacción antígeno-anticuerpo) y que establecieron la clasificación de la sangre en grupos sanguíneos a través de varios sistemas como el sistema ABO y el Rh, análisis que fueron introducidos de manera rutinaria a mediados de ese mismo siglo. Este avance contribuyó a la identificación de la isoimmunización Rh y de la incompatibilidad ABO, entre otros (Berger, 1999).

Otras patologías genéticas antes desconocidas pudieron ser identificadas a partir de la electroforesis en gel y la electroforesis 2D hacia los años 1960s y 1970s que permitieron el abordaje diagnóstico de las hemoglobinopatías, enfermedades altamente prevalentes en la humanidad y brindaron información que orientó el entendimiento de la estructura del primer gen y la proteína codificada por este (Weatherall, 2002).

La utilización de la sangre como medio para identificar patologías genéticas no fue restringido a las pruebas de hemoaglutinación, también, se utilizó la propiedad de transporte que tiene este tejido, teniendo en cuenta que en ella es posible encontrar otros componentes además de las células sanguíneas, como por ejemplo la creatina quinasa y la aldolasa, marcadores que fueron utilizados a partir de la década de 1950 en el diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne (SS, HH, SS, & al,

1961). De la misma forma, factores de la coagulación como los factores VIII y IX, contribuyeron al diagnóstico y seguimiento de enfermedades como la hemofilia (Mumford et al., 2014)

Adicionalmente se utilizó la medición de niveles séricos de hormonas con el propósito de identificar la presencia de defectos genéticos de origen endocrino, tal fue el caso de la TSH en el hipotiroidismo congénito (Illig et al., 1977) o la 17 hidroxiprogestero en la hiperplasia adrenal congénita (Grosse & Van Vliet, 2007)

8.4. El análisis del ADN

En la década de 1970 se introdujeron métodos que permitieron la secuenciación genómica de fragmentos inicialmente no mayores de 100 bp en el ámbito clínico, (Sanger & Nicklen, 1977), logrando determinar variantes en el número de copias de nucleótidos, adicionalmente otros métodos como el ensayo enzimático *in vitro* permitieron la evaluación de la actividad enzimática en diferentes tejidos (Bisswanger, 2014); con la llegada de la PCR (Mullis, 1990), los RFLPs (D Botstein, White, Skolnick, & Davis, 1980) y el *chromosomal walking-jumping* (Rommens et al., 1989), permitieron el análisis de secuencias genómicas y genes específicos, que se relacionan con patologías a las que no se había encontrado una causa por medio de las pruebas bioquímicas y citogenéticas debido al compromiso de uno o unos pocos nucleótidos, con estos nuevos métodos se logró una mayor resolución para el análisis del material genético.



Imagen 8.7. Termociclador utilizado en proceso de amplificación del ADN utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cortesía del CIGGUR, Bogotá, Colombia.

Finalizando las dos últimas décadas del siglo XX, métodos como MLPA (Stuppia, Antonucci, Palka, & Gatta, 2012), el análisis de STRs (*short tandem repeats*) o VNTRs (*variable number of tandem repeats*), facilitaron la creación de un mapa de haplotipos–HapMap- a comienzos del siglo XXI (International & Consortium, 2003), a través del cual se pudo reconocer la variabilidad genética de los humanos; además de su utilidad diagnóstica, los STRs fueron útiles con propósito de identificación y reconocimiento de relaciones filiales (R Chakraborty, Stivers, Su, Zhong, & Budowle, 1999).

Adicionalmente en esa misma década se introdujo el análisis del genoma completo a través de la CGH, dando la posibilidad de evaluar variantes en el número de copias a lo largo de todo el genoma (Forozan, Karhu, Kononen, Kallioniemi, & Kallioniemi, 1997); posteriormente los SNPs que

comenzaron a ser aplicados inicialmente para la identificación de loci relacionados con enfermedades complejas (Lai, 2001), fueron luego asociados con la CGH, lo que permitió optimizar la actividad de este tipo de pruebas aumentando su precisión (Lockwood, Chari, Chi, & Lam, 2005).

Ya entrados en el siglo XXI, la necesidad de métodos de alta eficiencia que permitan un análisis en corto tiempo y a costos razonables, impulsó el desarrollo de la secuenciación de siguiente generación –NGS-, permitiendo la secuenciación del genoma completo –WGS- o de las regiones codificantes –WES- (Heather & Chain, 2016). Una condición que marcó considerablemente el diagnóstico genético, fue la identificación de la heterogeneidad genética en muchos de las patologías estudiadas, por lo que se hacía necesario la evaluación simultánea de varios genes; en esta oportunidad, teniendo el conocimiento de cuales genes tienen una relación directa con la patología, se pudo agrupar en un solo ensayo un número de genes que presentan una alta penetrancia para una determinada condición, y por medio de paneles multigenes que aprovechan la tecnología de NGS, analizar e identificar de forma adecuada y en menor tiempo, cuál de ellos es el responsable del desarrollo de la enfermedad, es así como se llega al concepto de panel multigenes (Lincoln et al., 2015).

8.5. Análisis de los mecanismos no genómicos que controlan la expresión génica (epigenética)

De forma paralela al estudio de la estructura del ADN, se analizó la actividad funcional del mismo, evidenciándose que varios factores no relacionados con la secuencia genómica, se encontraban implicados en los procesos regulatorios de la expresión génica; es así como desde 1.950 se estudia la epigenética y los mecanismos implicados en estos procesos regulatorios como la metilación del ADN, los cambios en la configuración de las histonas, la expresión de ARN no codificante, etc., los cuales mostraron a su vez que puede influir las características fenotípicas de una forma deletérea

cuando están alterados; de esta forma se comenzó el estudio de alteraciones epigenéticas para establecer su relación con la presencia de patologías que aún no encontraban explicación por medio de los métodos antes mencionados.

8.6. Situación actual del diagnóstico en genética.

Como se puede apreciar, existe una amplia variedad de métodos con los cuales se puede abordar cada una de las diferentes causas etiológicas en una enfermedad o condición genética; sin embargo y a pesar de esto, no es posible realizar un análisis simultáneo de todas estas variables por medio de un único método, siendo necesario el análisis de forma individual, lo cual hace lento, y en algunas oportunidades tardío, un proceso de diagnóstico.

A pesar de realizar un adecuado abordaje clínico, aproximadamente un 30% de las enfermedades genéticas se quedan sin una causa identificada, lo que hace suponer que aún hay factores fisiológicos propios del ADN que se encuentran sin analizar o que hay factores a los que aún no se les ha analizado desde el punto de vista clínico.

Con el surgimiento de las ciencias ómicas, se ha presentado una reorganización del pensamiento diagnóstico en genética, debido a la concepción global de los procesos biológicos implicados en el desarrollo de una patología genética, surgidos a partir del reconocimiento de las interacciones entre los diferentes sistemas como la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica, etc.; dejando a un lado el concepto individualista de la lesión, es decir, que solo sea un factor el que determine la aparición de la enfermedad.

Con este concepto generalizado de patología se hace necesario evaluar la causa de la enfermedad, no solo como la consecuencia de un único fenómeno, ya sea este estructural o funcional, sino

también es necesario identificar toda la red de interacciones que presentan a partir de la lesión y de qué forma las alteraciones secundarias en esta red pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad, de esta forma por ejemplo, si se estudiara una mutación puntual en el ADN mitocondrial, sería necesario estudiar el producto de esta mutación y sus interacciones en forma de transcriptómica; para luego estudiar cómo estas alteraciones desde el punto de vista transcriptómico comprometen la red metabólica –metaboloma- del individuo afectado, para finalmente poder relacionarse con la expresión global del genoma en forma de fenoma.

A partir de la primera década del siglo XXI, se comenzó a explorar la forma para el análisis de estas interacciones, por lo que se propuso evaluar la relación entre las diferentes productos de la expresión génica, surgiendo la interactómica, la cual aprovecha las tecnologías de secuenciación y análisis de microarreglos que permite realizar el estudio del transcriptoma y del proteoma en una célula (Costello et al., 2005), para luego, a partir de esta información y con el concurso de otras tecnologías como la espectrometría de masas, la bioquímica o la bioinformática, poder establecer un mapa de interacciones o interactoma y por medio de este se pueda identificar el punto a partir del cual se modifica la función general y que desencadene el evento patológico (Feng, Zhou, Huang, Xie, & Nice, 2015).

Desde hace ya varios años, se ha reconocido el papel importante de las proteínas en los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, tanto para el diagnóstico, el pronóstico, así como para el establecimiento de blancos terapéuticos, por lo cual se establecieron diferentes métodos para el análisis de estas interacciones por medios informáticos –*in silico*- o en el laboratorio –*in vivo* o *in vitro*- (Feng et al., 2015; V. S. Rao, Srinivas, Sujini, & Kumar, 2014); sin embargo, la falta de precisión en los resultados de estos enfoques donde se han reportado hasta un 30% de falsos positivos cuando son verificados por otros métodos, sumado a la limitada cobertura, motiva a la utilización del interactoma como método para establecer estas relaciones (Feng et al., 2015).

La posibilidad de aplicaciones del análisis de interactoma es variada, la cual puede ir desde el análisis de las interacciones proteínicas que permitan identificar nuevos genes relacionados con la enfermedad, desde el cáncer (Yongsheng Li, Sahni, & Yi, 2016), por ejemplo, hasta la posibilidad de analizar la interacción entre los blancos terapéuticos y los genes causantes de la enfermedad (Sun, Zhu, Zheng, & Xu, 2015).

Un aspecto de relevancia en el análisis de estas redes de interacción, es la cantidad de información producida en cada evaluación, es por ellos que además de implementar métodos diagnósticos que puedan evaluar la interacción entre redes biológicas, es necesario contar con herramientas para un adecuado análisis; en este aspecto la bioinformática adquiere un papel preponderante, teniendo en cuenta el orden de magnitud de los resultados obtenidos en las pruebas.

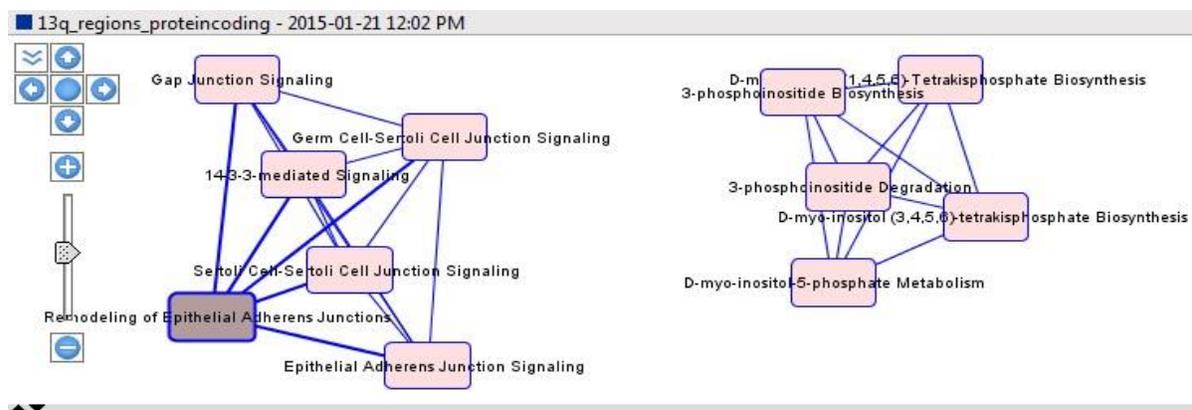


Imagen 8.8. Muestra las interacciones presentes entre un grupo de genes localizados en la región 13q11q12.12, este análisis se realiza por medio del programa INGENUITY a partir del resultado de una prueba de array CGH que mostro una perdida en dicha región. Cortesía de la doctora Claudia Silva, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

La bioinformática se entiende como la aplicación de técnicas de la informática al análisis de información de origen biológico y agrupa diferentes disciplinas como las matemáticas, la estadística y las ciencias computacionales, con el propósito de entender y organizar los datos obtenidos a gran escala expresados en términos de *gigabytes* que son originados a partir de pruebas asociada con la biología molecular como la secuenciación de siguiente generación (Luscombe, Greenbaum, & Gerstein, 2001).

El origen de la bioinformática fue inicialmente con propósitos investigativos, sin embargo con la introducción en el ámbito clínico y diagnóstico de las diferentes formas de secuenciación de siguiente generación, las cuales generaban un gran volumen de información, se comenzó su aplicación en el campo de la medicina, y se espera que esta aplicación continúe y se haga más “fuerte” con la introducción de nuevos métodos como es el caso de las ciencias omicas.

El proceso de análisis bioinformático conlleva varias etapas, la primera de ellas es la introducción en el sistema de la información proveniente de las pruebas genéticas, luego de ello, esta información es analizada por medio de algoritmos computacionales integrados en el *software*, los cuales establecen la red de interacciones propias de la estructura analizada (gen, proteína, etc.), luego del análisis bioinformático, los resultados relevantes deben ser almacenados de tal forma que sea posible tener fácil acceso para su consulta.

Con este propósito se han establecido diferentes plataformas o bases de datos bioinformáticos, sin embargo no todas estas plataformas permiten el libre acceso; adicionalmente, estas plataformas no siempre contienen información de todos los grupos étnicos –africanos, europeos, asiáticos, amerindios, etc.- ni cuentan con sistemas que permitan la integración de la información de variantes presentes en estas poblaciones específicas, y que se encuentren consignadas en bases de datos

externas que le permitan al consultor realizar una comparación entre sus resultados y resultados similares en otras poblaciones.

8.7. Visión del diagnóstico genético

Como se ha visto en los párrafos anteriores, la presentación de una condición genética puede ser dada por alteración estructural (pérdidas-ganancias), funcional o de regulación de la expresión (epigenéticos) del genoma, teniendo en cada caso un abordaje diagnóstico particular, el cual está basado, principalmente en los signos y síntomas que presenta el paciente o los antecedentes familiares que se relacionen con una condición particular; en este caso es necesario que la enfermedad se haya manifestado para poder confirmarla con alguna de las pruebas.

El reto futuro no solo para los métodos diagnósticos, sino también para el abordaje clínico, es la identificación de estas condiciones antes que presentes sintomatología, es decir una medicina predictiva, a través de la cual sea posible identificar la enfermedad de una manera precoz o en una fase pre sintomática y realizar las intervenciones correspondientes, sean estas preventivas, curativas o paliativas.

Adicionalmente, hay que tener en cuenta que al tratarse de un enfoque predictivo, no es posible indicar a que nivel se puede identificar la lesión, es decir, que se desconoce si el daño es a nivel cromosómico, a nivel genómico, a nivel epigenómico o a nivel de las interacciones, por lo cual se haría necesario realizar un “barrido” diagnóstico utilizando todos los enfoques diagnósticos de acuerdo al nivel de análisis; sin embargo esta práctica ocasiona un aumento considerable en los costos diagnósticos para el sistema de salud o para el paciente, por lo cual sería necesario sugerir otros enfoques posibles.

El primero de ellos surge del enfoque dado a las enfermedades con heterogeneidad genética, donde por medio de un único ensayo, se analizan de forma simultánea varios genes a través de NGS; sin embargo este nuevo enfoque diagnóstico que si se quiere llamar mono-prueba, debería estar en la capacidad de realizar el análisis de la muestra en los cuatro niveles mencionados con anterioridad (cromosómico, genómico, epigenómico e interactómico) por medio de una única prueba, la cual permita la identificación de las alteraciones en un solo paso, disminuyendo el tiempo de análisis y el costo económico de realizar un abordaje diagnóstico individual.

De no ser técnicamente posible la implementación de un único método, para el análisis de todas las alteraciones genéticas y epigenómica, otra propuesta es integrar las pruebas existentes en el momento en un único sistema, instrumento o equipo, el cual realice todas las pruebas por separado, y al mismo tiempo para que sus resultados sean integrados y correlacionados, de esta forma se pueda determinar el impacto general de la alteración, es decir establecer una red de interacciones.

En este último aspecto se considera que la bioinformática tiene un papel importante debido a la necesidad de integrar el gran volumen de información que pueda generarse a partir de las pruebas diagnósticas, por lo cual se debe optimizar el desempeño de la bioinformática. En este sentido es necesario, en primer lugar, contar con algoritmos en constante evolución que satisfagan los requerimientos diagnósticos; del mismo modo, es necesario mejorar la capacidad de almacenamiento y análisis de los equipos bioinformáticos y, desde luego, capacitar a profesionales del área de la salud para que sean estos los que realicen el análisis en pruebas diagnósticas o de relevancia médica.

De forma adicional al abordaje ómico de las pruebas diagnósticas en genética, es importante tener en cuenta que estas interacciones son diferentes, o varían de acuerdo al tejido u órgano que se evalúe, esto se debe a la expresión selectiva que es una propiedad de algunos genes, que les

permite que sea expresado en un determinado tejido con cierta magnitud y frecuencia, mientras ese mismo gen tiene una expresión reducida o, en otros casos aumentada, en otros tejidos.

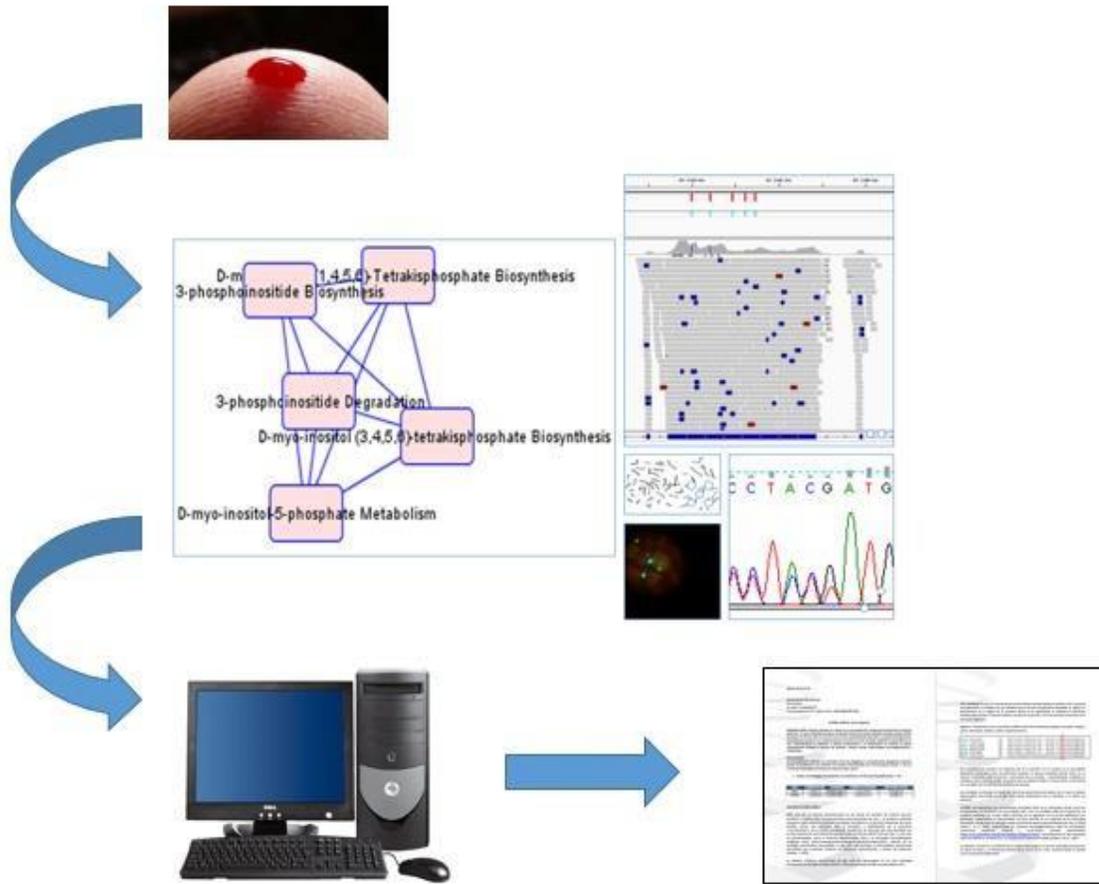


Imagen 8.9. Posible nuevo enfoque para el diagnóstico de patologías genéticas, basado en el análisis citogenético, genómico, epigenómico e interactómico realizado de forma simultánea y su posterior análisis bioinformático.

8.8 Conclusión

A través de la historia se han establecido métodos o pruebas con el propósito de identificar la causa de las alteraciones genéticas. Como se mencionó anteriormente, la variedad de pruebas genéticas responden a un requerimiento particular, como por ejemplo la CGH que es capaz de identificar pérdidas o ganancias de material genético que la hacen relevante para el diagnóstico de síndromes de microdelección o microduplicación. No obstante, esta prueba pasa por alto aspectos que son relevantes dentro de todo el contexto clínico ya que la CGH no permite la identificación de alteraciones balanceadas como las translocaciones balanceadas o las inversiones cromosómicas, por lo cual no son útiles para el diagnóstico de una translocación robertsoniana. Para identificar adecuadamente esta alteración, sería necesario aplicar otra prueba genética, como por ejemplo un cariotipo.

En el ejemplo anterior se muestra como a pesar de la precisión y el dinamismo técnico de una prueba genética, un único método diagnóstico no resuelve todos los interrogantes, más aun cuando no se tiene conocimiento de la presencia de otras alteraciones subyacentes, por lo cual se considera útil la implementación de métodos que puedan integrar ya sea físicamente las pruebas en una sola o bien que integre analíticamente los resultados de las mismas con el propósito de establecer un panorama global de la afección y las posibles consecuencias de la misma.

Para ello es necesario que las pruebas diagnósticas genéticas garanticen la cobertura completa de los genes o las regiones a ser analizadas y también los distintos elementos con los que pueda interactuar –red de interacciones-, además de disponer de un sistema de filtrado de variables que permita un acceso rápido de la información disponible en las diferentes bases de datos bioinformáticos, las cuales deben a su vez almacenar datos provenientes de las diversas poblaciones humanas alrededor del mundo. Finalmente, es necesaria la formación e integración de

profesionales de la salud en el papel de analistas bioinformáticos para lograr un adecuado abordaje clínico-patológico a partir de los resultados obtenidos en los análisis de laboratorio.

ANEXOS

Anexo 1. Reporte de los resultados del análisis realizado para el síndrome de Usher a través de un panel multigenes

Septiembre

Identificación del paciente:

Documento:

ID orden:

Tipo de espécimen/ID: Sangre total –

PANEL NGS PARA SINDROME USHER (12 GENES)

Indicación clínica: Paciente de 47 años de edad con antecedente de sordera y pérdida de visión progresiva.

De acuerdo a la solicitud se analizaron los siguientes genes: *ABHD12, CDH23, CIB2, CLRN1, DFNB31, GPR98, HARS, MYO7A, PCDH7, USH1C, USH16* y *USH2A*.

RESULTADOS: En los datos de secuenciación del panel génico se detectaron 5 variantes posiblemente relacionadas con el cuadro clínico de la paciente, dos de ellas con impacto en el fenotipo según Clinvar y las otras 3 predichas como patogénicas, según las herramientas bioinformáticas (SIFT y PolyPhen).

Tabla 1. Genes con hallazgos de variantes no-sinónimas clasificadas como patogénicas o posiblemente patogénicas según CLINVAR

GEN	CAMBIO EN EL ADN	CIGOSIDAD	CAMBIO EN LA PROTEINA	dbSNP	CLINVAR
<i>CDH23</i>	c.4021G>A	Heterocigoto	p.Asp1341Asn	rs121908351	Patogénico
<i>CDH23</i>	c.3625A>G	Heterocigoto	p.Thr1209Ala	rs41281314	Inter. conflictiva de patogenicidad

Tabla 2. Genes con hallazgos de variantes de secuencia predichas como patogénicas según herramientas bioinformáticas (SIFT y PolyPhen)

GEN	CAMBIO EN EL ADN	CIGOSIDAD	CAMBIO EN LA PROTEINA	dbSNP	SIFT	POLYPHEN
CDH23	c.7139C>T	Heterocigoto	p.Pro2380Leu	rs4747195	Dañino	Patogénico
MYO7A	c.5156A>G	Heterocigoto	p.Tyr1719Cys	rs77625410	Dañino	Patogénico
MYO7A	c.6240C>T	Heterocigoto	p.Ser2080Ser	rs41298757	Dañino	Patogénico

INTERPRETACIÓN CLÍNICA:

CDH23: Se identificaron 3 variantes heterocigotas no sinónimas (*'missense'*): c.3625A>G (p.Thr1209Ala) (dbSNP: rs41281314), c.4021G>A (p.Asp1341Asn) (dbSNP: rs121908351) y c.7139C>T (p.Pro2380Leu) (dbSNP: rs4747195). Este gen es miembro de la superfamilia de las caderinas y codifica para la caderina 23, una glicoproteína dependiente de calcio implicada en la unión intercelular. Mutaciones heterocigotas compuestas u homocigotas en este gen son causantes del síndrome Usher tipo 1D (USH1D) y sordera autosómica recesiva-12 (DFNB12) (OMIM 605516).

La variante heterocigota c.4021G>A tiene una significancia clínica concluyente por Clinvar ya que es considerada patogénica y relacionada con sordera autosómica recesiva-12 (DFNB12); además las herramientas bioinformáticas (SIFT, PolyPhen y *Mutation Taster*) la predicen como patogénica. La literatura sustenta dicha aproximación ya que se reporta en una familia afectada con pérdida de audición no sindrómica (de Brouwer, et al., 2003); por todo esto la variante heterocigota c.4021G>A, debe considerarse como mutación causante de enfermedad.

La variante c.3625A>G tiene una significancia clínica con interpretación conflictiva de patogenicidad ya que es considerada tanto benigna como patogénica e incierta relacionada con USH1D, según CLINVAR. Sin embargo, en la literatura hay evidencia para considerarla como variante de susceptibilidad. Un estudio de *'screening'* de mutaciones en dos genes (**CDH23** y **PCDH15**) en 76 afectados con USH1D, se observó que en una familia el afectado con sordera era heterocigoto compuesto para una delección en el gen y homocigoto para la variante en cuestión (p.Thr1209Ala), la cual ha sido previamente identificada en estado homocigoto en pacientes sordera. Estudios previos han demostrado que variantes de *'splicing'*, *nonsense* y *frameshift* homocigotas conllevan a USH1D típico, en tanto que la homocigosidad para mutaciones no sinónimas son causa de sordera no sindrómica o síndrome Usher atípico. Además, esta variante es patogénica debido a su localización en un dominio proteico muy conservado evolutivamente y que es funcionalmente importante, además de que esta variante no se ha identificado en ningún control (n=100) (Qing Yin Zheng, et al., 2005). En adición, los predictores *in silico* PolyPhen y Mutation Taster la consideran patogénica y causante de enfermedad, respectivamente.

La variante heterocigota c.7139C>T está clasificada como benigna por Clinvar y según un estudio en familias koreanas se identificó en 12 de 16 pacientes con sordera pero también en 26 de 30 exomas controles, por lo tanto no se le considera como causante de enfermedad. Sin embargo, la principal limitante de este estudio es el limitado número de pacientes y controles analizados, ya que una cohorte más grande permitirá identificar o descartar de manera más concluyente la relación de esta variante con la enfermedad. El alineamiento de la secuencia proteica (*Figura 1*) entre diferentes especies cercanas y lejanas evolutivamente, permitió observar la conservación del aminoácido Prolina. Por tanto, el cambio descrito (p.Pro2380Leu) en esta región conservada puede alterar la estructura y función de la caderina 23. Por tanto, a la espera de nuevos y más robustos estudios que corroboren dicha conclusión, esta variante debe considerarse de significado incierto (VUS) ya que según predictores *in silico* es patogénica (SIFT y PolyPhen).

Q9H251	CAD23_HUMAN	2377	NGSPPRAAEIPVYLEIVDINDNNPIFDQPSYQEAVFEDVPVGTI
H2RC60	H2RC60_PANTR	2254	NGSPPRAAEIPVYLEIVDINDNNPIFDQPSYQEAVFEDVPVGTI
F7GVJ2	F7GVJ2_MACMU	2381	NGSPPRAAEIPVYLEIVDINDNNPIFDQPSYQEAVFEDVPVGTV
G3S8I0	G3S8I0_GORGO	2319	NGSPPRAAEIPVYLEIVDINDNNPIFDQPSYQEAVFEDVPVGTI
F6XRX6	F6XRX6_HORSE	2334	NGSPPRAAEIPVYLEIVDINDNNPIFDQPSYQEAVFEDVPVGTV
F1P8X5	F1P8X5_CANLF	2382	NGSPPRAAEIPVYLEIVDVNDNNPIFDQPSYQEAVFEDVPVGTV
Q99PF4	CAD23_MOUSE	2377	NGSPPRAAEIPVYLEIVDINDNNPIFDQPSYQEAVFEDIAVGTV
Q6QQE1	Q6QQE1_DANRE	2380	HGSPPRFTELPVYLRIIDVNDNNPVFQQPLYQKSFEDVALGTI
			.*** ** :*:****.*:*.*****:*** **::*: **:

Figura 1: Alineamiento de la secuencia proteica de CDH23 entre el humano, chimpancé, mono, gorila, caballo, perro, ratón y pez cebra, en ese orden.

Por lo tanto, la señora presenta, en nuestra opinión, presenta un genotipo heterocigoto compuesto para mutaciones en el gen *CDH23*: c.4021G>A (p.Asp1341Asn)/c.3625A>G (p.Thr1209Ala), las cuales se han relacionado con el fenotipo que se estudia.

MYO7A: Se identificaron dos variantes posiblemente relacionadas con el cuadro clínico de la paciente, ambas heterocigotas y reportadas en bases de datos: c.5156A>G (p.Tyr1719Cys) (dbSNP: rs77625410) y c.6240C>T (p.Ser2080Ser) (dbSNP: rs41298757). Este gen codifica para la miosina VIIA clasificada como proteína poco convencional debido a su característica “cola” (dominio C-terminal) muy corta; interactúa con la actina importante en el transporte de moléculas y la estructura celular. Se expresa en el oído interno y en la retina teniendo un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de los estereocilios y del epitelio pigmentario retinal, respectivamente. Las mutaciones en este gen son causantes de síndrome Usher tipo 1B y sordera autosómica recesiva/dominante (OMIM 276903). La variante no sinónima c.5156A>G (p.Tyr1719Cys) está clasificada como benigna (Clinvar) y en la literatura la plantean como posiblemente no patogénica; el cambio p.Tyr1719Cys ha sido designado previamente en afectados como causante de enfermedad, pero según los estudios caso/control de esta variante la consideran como no patogénica dado que se ha hallado también en controles sanos (2/982) (Roux, et al., 2006). En otro estudio llevado a cabo por Nájera, et al. (2002), inicialmente se identificó dicha variante en pacientes con USH1 pero no se le halló en ningún control; sin embargo luego se incluyeron 50 controles adicionales identificando la variante en tres de ellos, por lo que el rol patogénico de este cambio aún está por determinarse. Por su parte las herramientas bioinformáticas SIFT y PolyPhen la predicen como patogénica. Ante estos hallazgos contradictorios la variante debe ser considerada como una variante de significado incierto (VUS).

La variante heterocigota c.6240C>T (p.Ser2080Ser) es una variante sinónima, es decir que el cambio en la secuencia de ADN no genera un cambio en la secuencia de la proteína. Sin embargo, es también una variante que se halla en un sitio de reconocimiento de ‘*splicing*’ y puede generar un cambio a

nivel del ARN mensajero (mARN) y por ende el producto proteico final, ya que está ubicada en el borde exón/intrón. A pesar de que la significancia clínica es predicha como benigna por Clinvar, la herramienta bioinformática *Human Splicing Finder* (HSF) predice que el cambio altera un sitio potenciador de 'splicing' exónico consecuentemente con potencial una alteración del empalme del mARN. Ante tal evidencia contradictoria esta variante debe considerarse como una variante de significado incierto (VUS).

ESTUDIOS ADICIONALES Y RECOMENDACIONES:

Debido a la herencia autosómica recesiva del síndrome Usher, a consideración del médico tratante se deben tener en cuenta las mutaciones heterocigotas compuestas, para analizar familiares afectados/no afectados (posibles portadores), principalmente las variantes c.3625A>G (p.Thr1209Ala) y c.4021G>A (p.Asp1341Asn) del gen *CDH23*. De esta forma se establecerá el origen parental y el riesgo de recurrencia de una manera precisa. Los resultados deben ser correlacionados con el cuadro clínico y ser entregados e interpretados en el contexto de un Asesoramiento Genético.

NOTA:

1. Se solicitó al paciente o quien lo representa un consentimiento informado para proceder a la realización del presente estudio genético.
2. Los resultados obtenidos en este informe deben ser considerados en el contexto de otros factores clínicos y patológicos del paciente.
3. El presente informe es confidencial y debe ser manejado basándose en estrictos criterios de privacidad.

Metodología

1. Extracción de ADN genómico de la muestra remitida.
2. Preparación de una librería de fragmentos del genoma a partir del ADN del paciente.
3. Amplificación clonal, seguida de la secuenciación de los genes de interés por la tecnología Illumina Hiseq2500.
4. La cobertura media del análisis es de 100X y para las variantes la profundidad promedio es 30X. Se analizaron los siguientes genes: *ABHD12*, *CDH23*, *CIB2*, *CLRN1*, *DFNB31*, *GPR98*, *HARS*, *MYO7A*, *PCDH7*, *USH1C*, *USH16* y *USH2A*.
5. Análisis bioinformático de las secuencias de ADN obtenidas por comparación con las secuencias nucleotídicas obtenidas y comparadas con la secuencia de referencia (HGM19)
6. Estudios predictivos *In silico* de las variantes de significado incierto mediante los programas SIFT y Polyphen con soporte en las base de datos públicas ClinVar y MAF.

Fundamento Biológico del Estudio: El síndrome Usher es un desorden autosómico recesivo clínica y genéticamente heterogéneo, en el cual la pérdida de audición neurosensorial está asociada con retinitis pigmentosa. Hay tres tipos clínicos: síndrome Usher tipo 1 (USH1), caracterizado por pérdida auditiva congénita profunda y disfunción vestibular; el síndrome Usher tipo II (USH2) caracterizado por pérdida de audición desde moderada hasta severa y función vestibular normal, y el síndrome Usher tipo 3 (USH3) asociado a pérdida de audición progresiva y función vestibular variable. El inicio de retinitis pigmentosa es variable en los tres tipos de USH, siendo de aparición prepuberal en el tipo 1 y tardía en los tipos 2 y 3 (Nájera, et al., 2002).

Vocabulario clave:

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple. SIFT: Software que predice si la sustitución de aminoácido afecta a la función de la proteína, la predicción se basa en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en la secuencia de alineaciones derivadas de secuencias estrechamente relacionadas, recogidos a través de PSI-BLAST. SIFT se puede aplicar a los polimorfismos no sinónimos de origen natural o mutaciones de sentido erróneo inducidas por el laboratorio. PolyPhen-2 (fenotipificación de un polimorfismo versión 2) es una herramienta computacional que predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína humana, usando consideraciones físicas y comparativas directas. ClinVar es un archivo de acceso público que muestra informes de las relaciones entre los humanos y las variaciones de fenotipos, con elementos de prueba y presenta informes de variantes encontradas en muestras de pacientes, afirmaciones hechas en cuanto a su importancia clínica, información sobre el remitente y otros datos de apoyo. MAF: Frecuencia alélica mínima.

Referencias

- Zheng QY, Yan D, Ouyang XM, Du LL, Yu H, Chang B, Johnson KR, Liu XZ. [Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans.](#) Hum Mol Genet. 2005 Jan 1;14(1):103-11. Epub 2004 Nov 10.
- [de Brouwer AP, Pennings RJ, Roeters M, Van Hauwe P, Astuto LM, Hoefsloot LH, Huygen PL, van den Helm B, Deutman AF, Bork JM, Kimberling WJ, Cremers FP, Cremers CW, Kremer H.](#) Mutations in the calcium-binding motifs of CDH23 and the 35delG mutation in GJB2 cause hearing loss in one family. [Hum Genet.](#) 2003 Feb;112(2):156-63. Epub 2002 Oct 29.
- A-F Roux, V Fauge`re, S Le Gue`dard, N Pallares-Ruiz, A Vielle, S Chambert, S Marlin, C Hamel, B Gilbert, S Malcolm, M Claustres. Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. J Med Genet 2006;43:763–768. doi:10.1136/jmg.2006.041954

COMENTARIOS FINALES: Los resultados fueron sub-contratados con la aprobación del paciente o su representante. Las muestras se enviaron correctamente identificadas y bajo un sistema de Cadena de Custodia. El análisis bioinformático complementario y la interpretación de resultados fue realizado por el equipo de diagnóstico genético molecular de Genética Molecular de Colombia Ltda.

Cordial saludo,

_____MD PhD
Genética Humana

_____MSc.
Genética Humana

Anexo 2. Resultado del análisis de un panel de 15 genes para cancer de mama/ovario

Agosto

Identificación del paciente:

Documento:

ID orden:

Tipo de espécimen/ID: Sangre total

PANEL NGS CANCER DE SENO Y OVARIO (15 GENES)

Indicación clínica: Paciente de 59 años con antecedente de cáncer de seno derecho y de útero a temprana edad, asociado a antecedentes familiares en primera línea. De acuerdo a la solicitud, se evaluaron los siguientes genes: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, FANCC, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51C, STK11* y *TP53*.

Además del panel génico solicitado se realizó un estudio ampliado analizando los siguientes genes adicionales: *APC, BMPR1A, CDC73, CDK4, CDKN1C, CDKN2A, EPCAM, EXT1, EXT2, FH, FLCN, MAX, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NSD1, PHOX2B, PMS2, PRKAR1A, RET, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4* y *WT1*.

RESULTADOS:

A partir de los datos de la secuenciación tanto del panel solicitado como del panel ampliado se identificó una variante no sinónima (cambio en la secuencia de ADN que sustituye un aminoácido por otro) de significado incierto, clasificada como patogénica por predictores *in silico*.

Tabla1. Gen con hallazgo de variante no sinónima clasificada como patogénica según predictores *in silico* (SIFT y/o PolyPhen)

GEN	CAMBIO EN EL ADN	CIGOSIDAD	CAMBIO EN PROTEINA	dbSNP	SIFT	POLYPHEN	CLINVAR
<i>PALB2</i>	c.1010T>C	Heterocigota	p.Leu337Ser	rs45494092	Deletérea	Benigna	Sig. incierto

INTERPRETACIÓN CLÍNICA:

PALB2: Se identificó la variante no sinónima c.1010T>C (p.Leu337Ser) en estado heterocigoto, reportada en bases de datos (dbSNP: rs45494092). Según los predictores SIFT y PolyPhen es considerada como patogénica y benigna, respectivamente. Su significancia clínica es incierta por Clinvar, ya que ha sido reportada tanto en casos como en controles (). El gen *PALB2* codifica para una proteína involucrada en la supresión tumoral; interactúa y co-localiza con la proteína BRCA2 para permitir una estable localización y acumulación intranuclear de dicha proteína. Además juega un rol crítico en la reparación por recombinación homóloga (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PALB2#conditions>). Mutaciones en este gen están involucradas con susceptibilidad al cáncer de seno, de ovario, de páncreas y anemia Fanconi (OMIM 610355). Esta variante debe clasificarse como variante de significado incierto (VUS).

ESTUDIOS ADICIONALES Y RECOMENDACIONES:

Los resultados deben ser correlacionados con el cuadro clínico y ser entregados e interpretados en el contexto de un Asesoramiento Genético.

NOTA:

1. Se solicitó al paciente o quien lo representa un consentimiento informado para proceder a la realización del presente estudio genético.
2. Los resultados obtenidos en este informe deben ser considerados en el contexto de otros factores clínicos y patológicos del paciente.
3. El presente informe es confidencial y debe ser manejado basándose en estrictos criterios de privacidad.

Metodología

7. Extracción de ADN genómico de la muestra remitida.
8. Preparación de una librería de fragmentos del genoma a partir del ADN del paciente.
9. Amplificación clonal, seguida de la secuenciación de los genes de interés por la tecnología Illumina Hiseq2500
10. La cobertura media del análisis es de 100X y para las variantes la profundidad promedio es 30X.
11. Análisis bioinformático de las secuencias de ADN obtenidas por comparación con las secuencias nucleotídicas obtenidas y comparadas con la secuencia de referencia (HGM19) para los genes del *panel NGS son ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, FANCC, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51C, STK11 y TP53*. Panel ampliado: *APC, BMPR1A, CDC73, CDK4, CDKN1C, CDKN2A, EPCAM, EXT1, EXT2, FH, FLCN, MAX, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NSD1, PHOX2B, PMS2, PRKAR1A, RET, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4 y WT1*.
12. Estudios predictivos *In silico* de las variantes de significado incierto mediante los programas SIFT y Polyphen con soporte en las base de datos públicas ClinVar y MAF.

Fundamento Biológico del Estudio: Mundialmente, el cáncer de seno es la neoplasia más frecuente en mujeres. En la actualidad, se diagnostica un millón de nuevos casos en el mundo y existen más de 4,4 millones de mujeres que padecen la enfermedad. Este tipo de cáncer es casi exclusivo de mujeres. En Colombia, es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres, causando una importante tasa de mortalidad (*Angarita et al. 2008*).

Referencias

- Angarita F, Acuña S. Cáncer de Seno: De la Epidemiología al tratamiento. 2008. Univ Med. 49: 344-372.
- Thompson ER, Goringe KL, Rowley SM, Wong-Brown MW, McInerny S, Li N^o, Trainer AH, Devereux L, Doyle MA, Li J, Lupat R, Delatycki MB; LifePool Investigators, Mitchell G, James PA, Scott RJ, Campbell IG. Prevalence of PALB2 mutations in Australian familial breast cancer cases and controls. Breast Cancer Res. 2015 Aug 19;17:111.

COMENTARIOS FINALES: Los resultados fueron sub-contratados con la aprobación del paciente o su representante. Las muestras se enviaron correctamente identificadas y bajo un sistema de Cadena de Custodia. El análisis bioinformático complementario y la interpretación de resultados fue realizado por el equipo de diagnóstico genético molecular de Genética Molecular de Colombia Ltda.

Cordial saludo,

MD PhD
Genética Humana

Anexo 3. Reporte de los resultados de un Exoma completo 23 mil genes

Julio

Identificación del paciente:

ID orden: 1605QHF-0010

Tipo de espécimen/ID: Sangre total – **ADN GMC EM-MR**

EXOMA CLÍNICO (23 mil Genes)

Indicación clínica: Estudio genético para cáncer de mama y Síndrome de Lynch.

RESULTADOS:

Se encontraron 6 variantes de secuencia relacionadas con el fenotipo.

Tabla 1. Genes con hallazgos de variantes de secuencia con una frecuencia alélica menor (MAF) menor o igual al 1% (≤ 0.01):

GEN	CAMBIO EN ADN	CIGOSIDAD	CAMBIO EN PROTEINA	dbSNP	SIFT	POLYPHEN
SGCA	c.585-2A>C	Homocigoto	No aplica	No reporta	No aplica	No aplica

Tabla 2. Genes con hallazgos de variantes no-sinónimas clasificadas como patogénicas según predictores *in silico*:

GEN	CAMBIO EN ADN	CIGOSIDAD	CAMBIO EN PROTEINA	dbSNP	SIFT	POLYPHEN
TTN	c.98912G>A	Heterocigoto	p.Arg32971His	rs4894028	Patogénico	Patogénico
	c.92131G>A	Heterocigoto	p.Val30711Met	rs747122	Patogénico	Patogénico
	c.71993G>A	Heterocigoto	p.Arg23998His	rs10164753	Patogénico	Patogénico
	c.7174G>A	Heterocigoto	p.Gly2392Ser	rs4894048	Patogénico	Patogénico
DYSF	c.3460G>A	Heterocigoto	p.Gly1154Ser	rs554800123	Tolerado	Patogénico

SGCA: El gen *SGCA* codifica para la proteína alfa sarcoglicano, la cual hace parte del complejo distrofina-glicoproteína (DGC). Este complejo es crítico para la estabilidad de las membranas de las fibras musculares y el anclaje de la actina del citoesqueleto a la matriz extracelular (Roberds *et al.*, 1994). Su expresión se encuentra actualmente relacionada únicamente con la fisiología del músculo estriado. Mutaciones en este gen resultan en distrofias musculares de extremidades de tipo 2D, una entidad de herencia autosómica recesiva (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SGCA>).

En el gen *SGCA* se identificó la variante c.585-2A>C en estado homocigoto. Es una variante nueva y no ha sido reportada previamente en bases de datos, la variante homocigota *a priori* no altera la secuencia de la proteína; sin embargo, es una variante poco frecuente con una frecuencia alélica menor (MAF) <1%, la cual puede tener un efecto en el *splicing*. Mediante el análisis informático realizado con *Human Splicing Finder* se considera que la variable en cuestión tiene una alta probabilidad de alterar el sitio aceptor de *splicing*. Por tanto, este cambio sinónimo puede afectar el procesamiento del transcrito (mRNA) y consecuentemente la síntesis de la proteína. Este hallazgo se debe considerar como una variante de significado desconocido (VUS).

TTN: Este gen codifica para una proteína del músculo estriado. La proteína está formada por múltiples dominios, aproximadamente 244, que contribuyen a su estructura. Estos dominios responden a la tensión desplegándose y volviéndose a renaturalizar de manera que la cadena polipeptídica actúa como un resorte dentro del sarcómero, siendo éste la unidad funcional y contráctil del músculo, evidenciando la importancia de la proteína en la contracción del músculo estriado y sus tejidos asociados (Kierszbaum, A. 2009). Las mutaciones de este gen se encuentran relacionadas con la distrofia muscular de tipo tibial (TMD), una entidad autosómica dominante caracterizada por debilidad y desgaste de los músculos de las piernas (Hackman, P. 2002). Adicionalmente se ha reportado su relación en cardiomiopatías congénitas (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TTN>).

La variante no sinónima (c.98912G>A) (p.Arg32971His) (rs4894028), en estado heterocigoto encontrada en el gen *TTN*, es considerada como patogénica mediante predictores *in silico* y de significancia incierta mediante *ClinVar*. Se realizó un análisis bioinformático y un ensayo de patogenicidad mediante la herramienta *MutationTaster* y el cambio de aminoácido entre Arginina e Histidina se considera patogénico. En cuanto a la variante (c.92131G>A), (p.Val30711Met), (rs747122), presenta la misma situación en donde los predictores *in silico* al igual que *MutationTaster*, la evidencian como patogénica. Estos hallazgos se deben considerar como variantes de significado desconocido (VUS).

Adicionalmente, para el gen *TTN*, se identificaron las variantes no sinónimas en estado heterocigoto: c.71993G>A (p.Arg23998His) (rs10164753) y c.7174G>A (p.Gly2392Ser) (rs4894048). Ambas variantes son consideradas como patogénicas según los predictores *in silico* *SIFT* y

PolyPhen; sin embargo, según ClinVar son de significado incierto y benigno, respectivamente, por tanto, deben ser consideradas variantes de significado desconocido (VUS).

El hallazgo de mutaciones en estado heterocigoto para el gen *TTN*, podría tener relación clínica con la entidad y la enfermedad en el paciente.

DYSF: El gen de la disferlina codifica para una proteína de la familia de las ferlinas, esta proteína se encuentra asociada al sarcolema. La disferlina está relacionada con la contracción del músculo y cuenta con múltiples dominios C2 los cuales están implicados en la fusión de membranas mediante el uso de calcio (Britton *et al.*, 2000). El gen *DYSF* tiene un rol importante en la reparación de fibras

musculares; adicionalmente, la proteína codificada interactúa con la caveolina-3, un tipo de proteína de membrana encontrada en los músculos esqueléticos que juega un papel importante en la formación de las caveolas (Matsuda *et al.*, 2001). Mutaciones en este gen han sido asociadas a distrofias musculares de extremidades de tipo 2B (LGMD2B), con herencia de tipo autosómica recesiva, de igual forma se ha asociado con la miopatía de Miyoshi. Eventos de *splicing* alternativo en este gen han sido evidenciados y resultan en diferentes transcritos de la proteína (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DYSF>).

En el paciente analizado se evidenció la variable c.3460G>A, (p.Gly1154Ser) (rs554800123) en estado heterocigoto, según predictores *in silico*, es considerada patogénica únicamente mediante *PolyPhen*. La variante no presenta publicaciones previas reportadas. Se realizó un análisis bioinformático mediante la herramienta *MutationTaster* y la predicción se considera patogénica. La entidad LGMD2B es de herencia autosómica recesiva y requiere el hallazgo de dos mutaciones, sean homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *DYSF*, por lo tanto, el hallazgo de una sola mutación en estado heterocigoto para el gen *DYSF*, no confirma la enfermedad en el presente paciente.

ESTUDIOS ADICIONALES Y RECOMENDACIONES:

Los resultados deben ser correlacionados con el cuadro clínico y ser entregados e interpretados en el contexto de un Asesoramiento Genético. El estudio de las variantes *SGCA* y *TTN* en los padres o en su ausencia, de algunos familiares en primer grado del paciente, podría aclarar el origen parental de la misma y en caso tal evidenciar su estado como portadores de la misma.

NOTA:

1. Se solicitó al paciente o quien lo representa un consentimiento informado para proceder a la realización del presente estudio genético.
2. Los resultados obtenidos en este informe deben ser considerados en el contexto de otros factores clínicos y patológicos del paciente.

3. El presente informe es confidencial y debe ser manejado basándose en estrictos criterios de privacidad.

Metodología

13. Extracción de ADN genómico de la muestra remitida.
14. Preparación de una librería de fragmentos del genoma a partir del ADN del paciente.
15. Amplificación clonal, seguida de la secuenciación de los genes de interés por la tecnología Illumina Hiseq2500.
16. La cobertura media del análisis es de 100X y para las variantes la profundidad promedio es 30X.
17. Análisis bioinformático de las secuencias de ADN obtenidas por comparación con las secuencias nucleotídicas obtenidas y comparadas con la secuencia de referencia (HGM19).
18. Estudios predictivos *In silico* de las variantes de significado incierto mediante los programas SIFT y Polyphen con soporte en las base de datos públicas ClinVar y MAF.

Fundamento Biológico del Estudio: La distrofia muscular de cinturas es una enfermedad hereditaria que pertenece al grupo de las distrofias musculares. Se caracteriza por afectar a los músculos que se encuentran situados próximos a caderas y hombros, ocasionando debilidad de los mismos. La enfermedad tiene carácter progresivo y tiende a empeorar con el paso del tiempo, provocando disminución de volumen y fuerza muscular. En el 90% de los casos existe herencia autosómica recesiva y únicamente en el 10% es de tipo autosómica dominante (Melia, MJ. *et al.*, 2013)

Vocabulario clave:

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple. **SIFT:** Software que predice si la sustitución de aminoácido afecta a la función de la proteína, la predicción se basa en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en la secuencia de alineaciones derivadas de secuencias estrechamente relacionadas, recogidos a través de PSI-BLAST. SIFT se puede aplicar a los polimorfismos no sinónimos de origen natural o mutaciones de sentido erróneo inducidas por el laboratorio. **PolyPhen-2** (fenotipificación de un polimorfismo versión 2) es una herramienta computacional que predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína humana, usando consideraciones físicas y comparativas directas. **ClinVar** es un archivo de acceso público que muestra informes de las relaciones entre los humanos las variaciones de fenotipos, con elementos de prueba y presenta informes de variantes encontradas en muestras de pacientes, afirmaciones hechas en cuanto a su importancia clínica, información sobre el remitente y otros datos de apoyo. **MAF:** Frecuencia alélica mínima.

Referencias

- Britton, S., Freeman, T., Vafiadaki, E., Keers, S., Harrison, R., Bushby, K., Bashir, R. The third human FER-1-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics* 68: 313-321, 2000.
- Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., de Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I., Udd, B. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 492-500, 2002.
- Matsuda, C., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I., Arahata, K., Brown, R. H., Jr. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum. Molec. Genet.* 10: 1761-1766, 2001
- [Melià MJ¹](#), [Kubota A](#), [Ortolano S](#), [Vílchez JJ](#), [Gámez J](#). Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain.* 2013 May;136(Pt 5):1508-17

- Roberds, S. L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R. D., Lim, L. E., Lee, J. C., Tome, F. M. S., Romero, N. B., Fardeau, M., Beckmann, J. S., Kaplan, J.-C., Campbell, K. P. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. Cell 78: 625-633, 1994.

COMENTARIOS FINALES: Los resultados fueron sub-contratados con la aprobación del paciente o su representante. Las muestras se enviaron correctamente identificadas y bajo un sistema de Cadena de Custodia. El análisis bioinformático complementario y la interpretación de resultados fue realizado por el equipo de diagnóstico genético molecular de Genética Molecular de Colombia Ltda.

Cordial saludo,

_____ MD PhD
Genética Humana

BIBLIOGRAFIA

- Abrahams, Z., & Benjeddou, M. (2011). The value of Non-CODIS miniSTR genotyping systems in forensic casework in South Africa. *African Journal of Biotechnology*, *10*(86), 19908–19912. <http://doi.org/10.5897/AJBX11.061>
- Agrawal, S., & Khan, F. (2005). Reconstructing recent human phylogenies with forensic STR loci: a statistical approach. *BMC Genetics*, *6*, 47. <http://doi.org/10.1186/1471-2156-6-47>
- Akanmu, A. S., Oyedeji, O. A., Adeyemo, T. A., & Ogbenna, A. A. (2015). Estimating the Risk of ABO Hemolytic Disease of the Newborn in Lagos, 2015, 5–10. <http://doi.org/10.1155/2015/560738>
- Akgül, S., Korkmaz, A., Yiğit, Ş., & Yurdakök, M. (2013). Neonatal hyperbilirubinemia due to ABO incompatibility: Does blood group matter? *Turkish Journal of Pediatrics*, *55*(5), 506–509.
- Akobeng, A. K. (2007). Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatrica*, *96*(3), 338–341. <http://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x>
- Akolekar, R., Farkas, D. H., VanAgtmael, A. L., Bombard, A. T., & Nicolaides, K. H. (2010). Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenatal Diagnosis*, *30*(10), 918–923. <http://doi.org/10.1002/pd.2582>
- Al-Agha, A. E., Ocheltree, A. H., & Al-Tamimi, M. D. (2012). Association between genotype, clinical presentation, and severity of congenital adrenal hyperplasia: A review. *Turkish Journal of Pediatrics*.
- Al-dughaiishi, T., Harrasi, Y. Al, Al-duhli, M., Al-rubkhi, I., Al-riyami, N., Al-riyami, A. Z., ... Gowri, V. (2016). Red Cell Alloimmunization to Rhesus Antigen Among Pregnant Women Attending a Tertiary Care Hospital in Oman 1, *31*(1), 77–80. <http://doi.org/10.5001/omj.2016.15>

- Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., & Soothill, P. W. (2007). Free fetal DNA in Maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis*, 27, 415–418. <http://doi.org/10.1002/pd>
- Albert, T. J., Molla, M. N., Muzny, D. M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., ... Gibbs, R. a. (2007). Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nature Methods*, 4(11), 903–905. <http://doi.org/10.1038/nmeth1111>
- Ali, M. K., Shazly, S. A., Ali, A. H., Abdelbadee, A. Y., & Abbas, A. M. (2012). Ultrasonographic soft markers of aneuploidy in second trimester fetuses. *Middle East Fertility Society Journal*, 17(3), 145–151. <http://doi.org/10.1016/j.mefs.2012.04.007>
- Almannai, M., Marom, R., & Sutton, R. (2016). Newborn screening: a review of history, recent advancements, and future perspectives in area of next generation sequencing. *Curr Opin Pediatr*, 28. <http://doi.org/10.1080/10408360802485305>
- Alper, C. A., & Propp, R. P. (1968). Genetic Polymorphism of the Third Component of Human Complement (C3). *The Journal of Clinical Investigation*, 47(April), 2181–2191.
- Altman, D. G., & Bland, J. M. (1994). Diagnostic Tests 1 Sensitivity and Specificity. *BMJ: British Medical Journal*, 308(June), 1552–1553. <http://doi.org/10.1258/phleb.2012.012J05>
- Alvarez, M. L., Khosroheidari, M., Kanchi Ravi, R., & DiStefano, J. K. (2012). Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney International*, 82(9), 1024–1032. <http://doi.org/10.1038/ki.2012.256>
- Alvo, A., Der, C., & Délano, P. (2010). Tamizaje universal de hipoacusia en el recién nacido. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, (1), 170–176.

Amendola, L. M., Dorschner, M. O., Robertson, P. D., Salama, J. S., Hart, R., Shirts, B. H., ... Jarvik, G.

P. (2015). Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: Challenges of variant classification. *Genome Research*, 25(3), 305–315. <http://doi.org/10.1101/gr.183483.114>

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. (2011). ACOG

Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis. *Obstetrics and Gynecology*, 117(486), 1028–1031. <http://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31821922c2>

Amos, B. (2000). Lessons from the history of light microscopy. *Nat Cell Biol*, 2(8), E151-2.

<http://doi.org/10.1038/35019639>

Andorno, R. (2004). The right not to know: an autonomy based approach. *Journal of Medical*

Ethics, 30(5), 435-9-40. <http://doi.org/10.1136/jme.2002.001578>

Andrieux, J., & Sheth, F. (2009). Comparative genomic hybridization array study and its utility in

detection of constitutional and acquired anomalies. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(10), 779–791.

Anguiano, A., Wang, B. T., Wang, S. R., Boyar, F. Z., Mahon, L. W., El Naggar, M. M., ... Strom, C. M.

(2012). Spectral Karyotyping for identification of constitutional chromosomal abnormalities at a national reference laboratory. *Molecular Cytogenetics*, 5(1), 3.

<http://doi.org/10.1186/1755-8166-5-3>

Applied Biosystems. (2012). Yfiler Users Manual. *Life Technologies*, 1–50. Retrieved from

https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041477.pdf

Aranzadi, E., Miramar, M., Cesar, M. A., & Escanero, J. F. (2006). Evaluacion del test de azul de

dimetilmetileno (DMB) en el screening de las mucopolisacaridosis y su comparacion con la

prueba del cetilpiridino (CPC). *Rev Diagn Biol.*, 55(1), 17–21.

Araújo, A., Gomes, M., Teixeira, A., Coelho, A., & Medeiros, R. (2015). The Role of Biobanks in Oncology Research – A Portuguese Perspective. *Journal of Intellectual Disability - Diagnosis and Treatment*, 3(2), 63–69. <http://doi.org/10.6000/2292-2598.2015.03.02.3>

Armendares, S., Buentello, L., Salamanca, F., & Lisker, R. (1990). Utilidad de los heteromorfismos cromosómicos obtenidos por bandas G para la identificación de ilegitimidad. *Archivos de investigación médica*, 21(2), 189–193. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4435292>

Arrighi, F. E., & Hsu, T. C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10(2), 81–86.

Atkinson A.J., J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., ... Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <http://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>

Austin, C. (1954). Modified Snellen chart for vision screening. *Public Health Reports Washington DC* 1974, 69(7), 668–670.

Avent, N. D., & Reid, M. E. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood*, 95(2), 375–387. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043232>

Avent, N. D., & Reid, M. E. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood*, 95(2), 375–87. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043232>

Ayuso, C., Millán, J. M., Mancheño, M., & Dal-Ré, R. (2013). Informed consent for whole-genome sequencing studies in the clinical setting. Proposed recommendations on essential content

and process. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 21(10), 1054–9.

<http://doi.org/10.1038/ejhg.2012.297>

Azofeifa, J., Fauth, C., Kraus, J., Maierhofer, C., Langer, S., Bolzer, A., ... Speicher, M. R. (2000). An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1684–1688.

<http://doi.org/10.1086/302875>

Baerlocher, G. M., Vulto, I., de Jong, G., & Lansdorp, P. M. (2006). Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nature Protocols*, 1(5), 2365–2376.

<http://doi.org/10.1038/nprot.2006.263>

Baptista-gonzález, H., Hernández-martínez, J. A., Galindo-delgado, P., Santamaría-hernández, C., & Rosenfeld-mann, F. (2009). Usefulness of direct antiglobulin test in neonatal screening. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 66, 502–510.

Barreda, J. D. E. L. a. (2010). Biomarcadores epigenéticos. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 85–112.

Barrera Avellaneda, L. (2009). Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia, durante dos décadas. *Rev Acad Colomb Cienc*, 33(128), 377–394. Retrieved from

http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_33/128/377-394.pdf

Barreto, G., Vago, A. R., Ginther, C., Simpson, A. J., & Pena, S. D. (1996). Mitochondrial D-loop “signatures” produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. *American Journal of Human Genetics*, 58(3), 609–616.

Bauman, J. G., Wiegant, J., & van Duijn, P. (1981). Cytochemical hybridization with fluorochrome-labeled RNA. I. Development of a method using nucleic acids bound to agarose beads as a

model. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 29, 227–237. <http://doi.org/10.1177/29.2.6166653>

Bäumler, M., Faure, J. M., Bigorre, M., Bäumler-Patris, C., Boulot, P., Demattei, C., & Captier, G. (2011). Accuracy of prenatal three-dimensional ultrasound in the diagnosis of cleft hard palate when cleft lip is present. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 38(4), 440–444. <http://doi.org/10.1002/uog.8933>

Bayazit, Y. A., & Yilmaz, M. (2006). An overview of hereditary hearing loss. *ORL*. <http://doi.org/10.1159/000091090>

Beal, M. A., Glenn, T. C., & Somers, C. M. (2012). Whole genome sequencing for quantifying germline mutation frequency in humans and model species: Cautious optimism. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 750(2), 96–106. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.11.002>

Beauchamp, T. (2008). The Belmont Report. *The Oxford Textbook of Clinical Research Ethics*, 1–10. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=vKFYAtcLXgC&oi=fnd&pg=PA149&dq=The+belmont+report&ots=Ik-b2WdUi3&sig=47hU6RE074DjZSisJIZPdP_4a7s%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=vKFYAtcLXgC&oi=fnd&pg=PA149&dq=The+Belmont+Report&ots=Ik-b2WdUj5&sig=

Beauchamp, T. L. (2011). Informed Consent: Its History, Meaning, and Present Challenges. *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*, 20, 515–523. <http://doi.org/doi:10.1017/S0963180111000259>

Beauchamp and Childress, T. J. (2001). Principles of Medical Ethics. *Oxford University Press*, 454.

- Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., & Vincent, Q. B. (2014). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants.
- Belmonte, F. R., Martin, J. L., Frescura, K., Damas, J., Pereira, F., Tarnopolsky, M. A., & Kaufman, B. A. (2016). Digital PCR methods improve detection sensitivity and measurement precision of low abundance mtDNA deletions. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 25186. <http://doi.org/10.1038/srep25186>
- Bennike, T., Birkelund, S., Stensballe, A., & Andersen, V. (2014). Biomarkers in inflammatory bowel diseases : Current status and proteomics identification strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 20(12), 3231–3244. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3231>
- Berg, J. S., Amendola, L. M., Eng, C., Van Allen, E., Gray, S. W., & Wagle, N. (2013). Processes and preliminary outputs for identification of actionable genes as incidental findings in genomic sequence data in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Genet Med.*, 15(11), 860–867. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>.Investigations
- Berger, D. (1999). A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory. *Medical Laboratory Observer*, 31, 28–30, 32, 34–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162198>
- Bhati, A., Garg, H., Gupta, A., Chhabra, H., Kumari, A., Patel, T., ... Pdwhuldo, V. K. (2012). Omics of Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13(9), 4229–4233.
- Bick, D., & Dimmock, D. (2011). Whole exome and whole genome sequencing. *Current Opinion in Pediatrics*, 23(6), 594–600. <http://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32834b20ec>
- Bickmore, W. a, Human, M. R. C., & Unit, G. (2001). Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *Life Sciences*. <http://doi.org/10.1038/npg.els.0001160>

- Biesecker, B. B. (2001). Goals of genetic counseling. *Clinical Genetics*, 60(5), 323–330.
<http://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2001.600501.x>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Prospective in Science*, 1, 41–55.
[http://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90057-C](http://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90057-C)
- Bjugn, R., & Gjertsen, B. T. (2012). Human cells and the Norwegian Health Research Act. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 132(5), 540–542. <http://doi.org/10.4045/tidsskr.11.1076> [pii]
- Blau, N., Spronsen, F. J. Van, & Levy, H. L. (2010). Phenylketonuria. *Lancet*, 376, 1417–1427.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60961-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60961-0)
- Boehm, C. D. (1989). Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. *Clinical Chemistry*.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314–331.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686077&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bowman, J. (2006). Rh-immunoglobulin: Rh prophylaxis. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. <http://doi.org/10.1016/j.beha.2005.03.003>
- Brandstätter, A., Parsons, T. J., & Parson, W. (2003). Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *International Journal of Legal*

Medicine, 117(5), 291–298. <http://doi.org/10.1007/s00414-003-0395-2>

Brent, R. (1999). Functional genomics: learning to think about gene expression data. *Curr.Biol.*, 9(9), R338–R341.

Breviglieri, G., Bassi, E., Carlassara, S., Cosenza, L. C., Pellegatti, P., Guerra, G., ... Borgatti, M. (2016). Y-chromosome identification in circulating cell-free fetal DNA using surface plasmon resonance. *Prenatal Diagnosis*, 36. <http://doi.org/10.1002/pd.4788>

Brezina, P. R., Anchan, R., & Kearns, W. G. (2016). Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(7), 823–832. <http://doi.org/10.1007/s10815-016-0740-2>

Brezina, P. R., Tobler, K., Benner, A. T., Du, L., Xu, X., & Kearns, W. G. (2016). All 23 Chromosomes have Significant Levels of Aneuploidy in Recurrent Pregnancy Loss Couples. *Fertility and Sterility*, 97(3), S7. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.014>

British society of human Genetics. (2010). Report on the Genetic Testing of Children 2010 British Society for Human Genetics.

Brothman, A. R., Person, D. L., & Shaffer, L. G. (2010). Nomenclature Evolution : Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 Edition. *Cytogenetic and Genome Research*, 127, 1–4. <http://doi.org/10.1159/000279442>

Brothman, A. R., Schneider, N. R., Saikevych, I., Cooley, L. D., Park, J. P., Persons, D. L., ... Vance, G. H. (2006). Cytogenetic Heteromorphisms Survey Results and Reporting Practices of Giemsa-Band Regions that we have pondered for years. *Arch Pathol Lab Med*, 130, 947–949.

Brown, S., Gersen, S., Anyane-Yeboah, K., & Warburton, D. (1993). Preliminary definition of a “critical region” of chromosome 13 in q32: Report of 14 cases with 13q deletions and review

of the literature. *American Journal of Medical Genetics*, 45, 52–59.

<http://doi.org/10.1002/ajmg.1320450115>

Bruce, C., Stone, K., Gulcicek, E., & Willimas, K. (2014). Proteomic analysis of proteomic data: 2013 overview of current protein-profiling technologies. *Curr Protoc Bioinformatics*, 1–21. <http://doi.org/10.1002/0471250953.bi1321s41>. Proteomics

Burgess, M. M. (2001). Beyond consent: ethical and social issues in genetic testing. *Nature Reviews. Genetics*, 2(2), 147–151. <http://doi.org/10.1038/35052579>

Bustamante-Aragón, A., Rodríguez de Alba, M., Perlado, S., Trujillo-Tiebas, M. J., Arranz, J. P., Díaz-Recasens, J., ... Ramos, C. (2012). Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene*. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.045>

Butler, J. M. (2003). Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic Science Review*, 15(July), 91–111. Retrieved from http://class.csueastbay.edu/anthropologymuseum/2006IA/DNA_PDFS/yDNA/Butler.pdf

Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*. <http://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x>

Butler, J. M. (2007). Short Tandem Repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*, 43(4), i–v. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.018>

Butler, J. M., & Levin, B. C. (1998). Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in Biotechnology*, 16(4), 158–162. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01173-1](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01173-1)

- Büyükgöz, A. (2013). Newborn screening for congenital hypothyroidism. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 5(Suppl 1), 8–12. <http://doi.org/10.4274/jcrpe.845>
- Cabrera, V., Alberto, L., Ceballos, W., López, S., Lucía, M., Ruth, N., ... Bioética, R. C. De. (2010). Consideraciones éticas y legales de los biobancos para investigación. *Revista Colombiana de Bioética*, 5(1), 121–141.
- Calafell, F., Shuster, A., Speed, W. C., Kidd, J. R., & Kidd, K. K. (1998). Short tandem repeat polymorphism evolution in humans. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 6, 38–49.
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., ... Croce, C. M. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 353(17), 1793–1801. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa050995>
- Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, S., Tucker, E. J., ... Bruno, D. L. (2012). Molecular Diagnosis of infantile Mitochondrial disease with TargetedNext-Generation Sequencing. *Sci Transl Med.*, 4, 1–28. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003310>.Molecular
- Calzolari, A., Napolitano, M., & Bravo, E. (2013). Review of the Italian current legislation on research biobanking activities on the eve of the participation of national biobanks' network in the legal consortium BBMRI-ERIC. *Biopreservation and Biobanking*, 11(2), 124–8. <http://doi.org/10.1089/bio.2012.0058>
- Cameron, M., & Moran, P. (2009). Prenatal screening and diagnosis of neural tube defects. *Prenatal Diagnosis*, 29, 402–411. <http://doi.org/10.1002/pd>
- Campbell, S. (1969). The prediction of fetal maturity by ultrasonic measurement of the biparietal diameter. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth*, 76(7),

603–609.

Campbell, S. (2013). A short history of sonography in obstetrics and gynaecology. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 5(3), 213–29. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3987368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cardozo Sarubbi, O., Lopéz, B., & Manzitti, J. (2009). Actualización de las manifestaciones oculares de las enfermedades metabólicas más frecuentes vistas en el Servicio de Oftalmología del Hospital Garrahan, 88–95.

Carrera, J. M., Torrents, M., Mortera, C., Cusí, V., & Muñoz, a. (1995). Routine prenatal ultrasound screening for fetal abnormalities: 22 years' experience. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology : The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. <http://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1995.05030174.x>

Caspersson, T., Zech, L., & Johansson, C. (1970). Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Experimental Cell Research*, 62(2), 490–492.

Caspersson, T., Zech, L., & Johansson, C. (1999). Analysis of Human Metaphase Chromosome Set by Aid of DNA-Binding Fluorescent Agents, 304, 302–304.

Castañeda Fernandez, M. (2013). *Estudio de los microsatélites y miniSTRs del cromosoma X de aplicación forense*. Cantabria.

Catsburg, A., van der Zwet, W. C., Morré, S. A., Ouburg, S., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Savelkoul, P. H. M. (2007). Analysis of multiple single nucleotide polymorphisms (SNP) on DNA traces from plasma and dried blood samples. *Journal of Immunological Methods*, 321(1–2), 135–141. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2007.01.015>

- Cawood, A. H. (1989). DNA Fingerprinting a b. *Clin. Chem.*, 35(9), 1832–1837.
- CCMG Cytogenetics Committee. (2010). CCMG Practice Guidelines for Cytogenetic Analysis C .
Recommendations for the indications , analysis and reporting of cancer specimenes.
Canadian College of Medical Genetics, 1–12.
- Cecilia Lai-wan, C., Eric, B., & Celia Hoi-yan, C. (2006). Attitudes to and practices regarding sex selection in China. *Prenatal Diagnosis*, 26(7), 610–613. <http://doi.org/10.1002/pd.1477>
- Chakraborty, R., Shaw, M., & Schull, W. J. (1974). Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, 26(4), 477–488.
- Chakraborty, R., & Stivers, D. N. (1996). Paternity Exclusion by DNA Markers: Effects of Paternal Mutations. *Journal of Forensic Sciences*, 41(4), 671–677.
- Chakraborty, R., Stivers, D. N., Su, B., Zhong, Y., & Budowle, B. (1999). The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*, 20(8), 1682–1696. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990101\)20:8<1682::AID-ELPS1682>3.0.CO;2-Z](http://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:8<1682::AID-ELPS1682>3.0.CO;2-Z)
- Chakravarti, A., & Li, C. (1983). The Probability of Exclusion Based on the HLA locus. *American Journal of Human Genetics*, 35, 1048–1052.
- Chan, E. Y. (2009). Next-generation sequencing methods: impact of sequencing accuracy on SNP discovery. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 578, 95–111.
http://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_5
- Chance, M. R., Bresnick, A. R., Burley, S. K., Jiang, J.-S., Lima, C. D., Sali, A., ... Wang, L. K. (2002). Structural genomics: a pipeline for providing structures for the biologist. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 11(4), 723–738. <http://doi.org/10.1110/ps.4570102>

- Chen, J., Chen, Y., Gu, L., Li, X., Gao, Y., Lyu, X., ... Duan, J. (2016). LncRNAs act as prognostic and diagnostic biomarkers in renal cell carcinoma : a systematic review and meta-analysis Study characteristics.
- Chih-Kuang, C., Shuan-Pei, L., Shyue-Jye, L., & Tuen-Jen, W. (2002). MPS screening methods, the berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in Sanfilippo and Morquio syndromes. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *16*(5), 253–258. <http://doi.org/10.1002/jcla.10051>
- Chitty, L. S., Finning, K., Wade, A., Soothill, P., Martin, B., Oxenford, K., ... Massey, E. (2014). Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *349*, g5243. <http://doi.org/10.1136/bmj.g5243>
- Choo, S. Y. (2007). The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, *48*(1), 11–23. <http://doi.org/10.3349/ymj.2007.48.1.11>
- Chou, C.-H., & Yang, M.-H. (2014). Karyotype Analysis. *Bio-Protocol*, *4*(10), 4–6.
- Chyi-Ying A. Chen, Nader Ezzeddine, and A.-B. S. (2008). Messenger RNA half-life Measurements in mammalian cells. *Methods Enzymology*, *18*(448), 335–357. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02617-7](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02617-7). Messenger
- Civelli, O. (1998). Functional genomics: The search for novel neurotransmitters and neuropeptides. In *FEBS Letters* (Vol. 430, pp. 55–58). [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00524-9](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00524-9)
- Clare, G. (2012). The in vitro mammalian chromosome aberration test. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *817*, 69–91. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6_5
- Clarke, S. (2002). Tandem mass spectrometry: The tool of choice for diagnosing inborn errors of

metabolism? *British Journal of Biomedical Science*, 59(1), 42–46.

[http://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01437-9](http://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01437-9)

Colah, R. B., Surve, R., Sawant, P., D'Souza, E., Italia, K., Phanasgaonkar, S., ... Gorakshakar, A. C. (2007). HPLC studies in hemoglobinopathies. In *Indian Journal of Pediatrics* (Vol. 74, pp. 657–662). <http://doi.org/10.1007/s12098-007-0117-8>

Collins, P. J., Hennessy, L. K., Leibelt, C. S., Roby, R. K., Reeder, D. J., & Foxall, P. A. (2004). Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit. *Journal of Forensic Sciences*, 49(6), 1265–1277. <http://doi.org/10.1520/JFS2002195>

Colombia. Congreso de la República. (2012). Ley Estatutaria No. 1581 “por la cual se dictan disposiciones generales para la protección de datos personales”. *Superintendencia de Industria Y Comercio, ley 1581*, 1–15. <http://doi.org/Research Study 292>

Colombia. Congreso de la República. Código Civil Colombiano., 2Leyer 1–898 (2013). Colombia. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Colombia, R. de. (1993). Decreto Número 1571 de 1993. *Diario Oficial*, 1993(40), 27. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Conner, S. N., Longman, R. E., & Cahill, A. G. (2014). The role of ultrasound in the diagnosis of fetal genetic syndromes. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 28(3), 417–28. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.01.005>

Connor, H. (2012). Medieval uroscopy and its representation on misericords--part 1: Uroscopy. *Clinical Medicine (London, England)*, 1(6), 507–509. <http://doi.org/10.7861/clinmedicine.1-6-507>

- Consortium, C. elegans S. (1998). Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012–8.
<http://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Contreras, N., Silva, C., & Mateus, H. (2009). *Citogenetica aplicada a la medicina* (Primera). Bogota: Universidad del Rosario.
- Corcoran, C., Rani, S., & O'Driscoll, L. (2014). MiR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. *Prostate*, 74(13), 1320–1334. <http://doi.org/10.1002/pros.22848>
- Corredor, C. (1994). Separación rápida de leucocitos de sangre periférica. *Revista de La Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 42(1), 5–8.
- Costello, C. M., Mah, N., Hessler, R., Rosenstiel, P., Waetzig, G. H., Hahn, A., ... Schreiber, S. (2005). Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Medicine*, 2(8), 0771–0787. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020199>
- Cottrell, C. E., Al-Kateb, H., Bredemeyer, A. J., Duncavage, E. J., Spencer, D. H., Abel, H. J., ... Pfeifer, J. D. (2014). Validation of a next-generation sequencing assay for clinical molecular oncology. *Journal of Molecular Diagnostics*, 16(1), 89–105.
<http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.10.002>
- Coulm, B., Coste, J., Tardy, V., Ecosse, E., Roussey, M., Morel, Y., & Carel, J.-C. (2012). Efficiency of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in children born in mainland France between 1996 and 2003. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 166(2), 113–20. <http://doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.774>
- Covas, María del C., Medina, María S., Ventura, Silvia, Gamero, Dora, Giuliano, Antonio, Esandi, María

- E., & Alda, Ernesto. (2009). Enfermedad hemolítica por incompatibilidad ABO y desarrollo de ictericia grave en recién nacidos de término: factores predictivos precoces. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 107(1), 16–25. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752009000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Cox, J. T. (2009). History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 45 Suppl 1, S3–S12. [http://doi.org/10.1016/S1386-6532\(09\)70002-2](http://doi.org/10.1016/S1386-6532(09)70002-2)
- Cox, K. H., DeLeon, D. V, Angerer, L. M., & Angerer, R. C. (1984). Detection of mrnas in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Developmental Biology*, 101, 485–502. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90162-3](http://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90162-3)
- Crossle, J., Elliot, R. B., & Smith, P. (1979). DRIED-BLOOD SPOT SCREENING FOR CYSTIC FIBROSIS IN THE NEWBORN. *The Lancet*, 313(8114), 472–474. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(79\)90825-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(79)90825-0)
- Crow, E. W., & Crow, J. F. (2002). 100 Years Ago: Walter Sutton and the Chromosome Theory of Heredity. *Genetics*, 160(1), 1 LP-4. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/160/1/1.abstract>
- Cystic Fibrosis Foundation. (2013). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report. *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report. Be- Thesda (MD)*, 1–15. <http://doi.org/10.1183/09031936.00196314.2>
- DABIR, T. (2006). Oxford Desk Reference: Clinical Genetics. *The Ulster Medical Journal*, 75(3), 235.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1891769/>

- Dahdouh, E. M., Balayla, J., Audibert, F., Wilson, R. D., Brock, J.-A., Campagnolo, C., ... Vallée-Pouliot, K. (2015). Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal D'obstétrique et Gynécologie Du Canada : JOGC*, 37(5), 451–63. [http://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30261-9](http://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30261-9)
- Dalton, E., & Thompson, J. (2015). Overview of multi-gene panels for hereditary cancer. *Ann Transl Med*, 3, 2–3. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.AB054>
- Dandona, P., Hodson, M., Bell, J., Ramdial, L., Beldon, I., & Batten, J. C. (1981). Serum immunoreactive trypsin in cystic fibrosis. *Thorax*, 36(1), 60–62. <http://doi.org/10.1136/thx.36.1.60>
- Danna, K., & Nathans, D. (1971). Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonuclease of Hemophilus Influenzae *. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68(12), 2913–2917.
- Dean, L. (2005). Hemolytic disease of the newborn. In B. Beck (Ed.), *Blood Groups and Red Cell Antigens* (pp. 1–4).
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2005). *Molecular diagnostics: Promises and possibilities. Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. <http://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4>
- Deepa, Alwar, V. A., Rameshkumar, K., & Ross, C. (2011). ABO blood groups and malaria related clinical outcome. *Journal of Vector Borne Diseases*, 48(1), 7–11.
- DePristo, M. a. (2010). The \$1,000 Genome: The Revolution in DNA Sequencing and the New Era of Personalized Medicine. *The American Journal of Human Genetics*, 87(6), 742. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.10.027>

- Desai, R., & Creger, W. P. (1963). Maternofetal Passage of Leukocytes and Platelets in Man. *Blood*, 21(6), 665–673.
- Dewey, F. E., Grove, M. E., Pan, C., Goldstein, B. A., Bernstein, J. A., Chaib, H., ... Assimes, T. L. (2016). Clinical Interpretation and Implications of Whole-Genome Sequencing, 94305(10), 1035–1044. <http://doi.org/10.1001/jama.2014.1717>
- Dey, M., Sharma, S., & Aggarwal, S. (2013). Prenatal screening methods for aneuploidies. *North American Journal of Medical Sciences*, 5(3), 182–190. <http://doi.org/10.4103/1947-2714.109180>
- Dhallan, R., Au, W., Mattagajasingh, S., & al, et. (2004). Methods to increase the percentage of free fetal dna recovered from the maternal circulation. *JAMA*, 291(9), 1114–1119. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/jama.291.9.1114>
- Diegoli, T. M. (2015). Forensic Science International : Genetics Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes. *Forensic Science International: Genetics*. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.013>
- Ding, C., Chiu, R. W. K., Lau, T. K., Leung, T. N., Chan, L. C., Chan, A. Y. Y., ... Lo, Y. M. D. (2004). MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10762–10767. <http://doi.org/10.1073/pnas.0403962101>
- Dirks, R. W., Van Gijlswijk, R. P., Vooijs, M. A., Smit, A. B., Bogerd, J., van Minnen, J., ... Van der Ploeg, M. (1991). 3'-end fluorochromized and haptenized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple, simultaneous RNA detection. *Experimental Cell Research*, 194, 310–315. [http://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90370-A](http://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90370-A)

- Domchek, S. M., Bradbury, A., Garber, J. E., Offit, K., & Robson, M. E. (2013). Multiplex genetic testing for cancer susceptibility: Out on the high wire without a net? *Journal of Clinical Oncology*. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.9403>
- DONALD, I. (1962). Clinical application of ultrasonic techniques in obstetrical and gynaecological diagnosis. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Empire*, 69, 1036.
- Donald, I., Macvicar, J., & Brown, T. G. (1958). Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. *Lancet*, 1(7032), 1188–1195. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(58\)91905-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(58)91905-6)
- Dreesen, J., Destouni, A., Kourlaba, G., Degn, B., Mette, W. C., Carvalho, F., ... Traeger-Synodinos, J. (2014). Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 22(8), 1012–8. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2013.277>
- Drets, E. (2002). Una saga citogenética : El descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico . Significado y proyección bio-médica, 107–121.
- Drets, M. E., & Shaw, M. W. (1971). Specific Banding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68(9), 2073–2077.
- Durie, E. B. (1952). The Rh factor. *The Medical Journal of Australia*, 1(21), 716–719.
<http://doi.org/10.1097/00006254-195106000-00016>
- Dussault, J. H. (2014). The Anecdotal History of Screening for Congenital Hypothyroidism, 84(12), 4332–4334.
- Dussault, J. H., & Laberge, C. (1973). [Thyroxine (T4) determination by radioimmunological method in dried blood eluate: new diagnostic method of neonatal hypothyroidism?]. *L'union medicale du Canada*, 102(10), 2062–2064.
- Dutrillaux, B., & Lejeune, J. (1975). New techniques in the study of human chromosomes: methods

- and applications. *Advances in Human Genetics*, 5, 119–156.
- Eagle, H. (1955). Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science*, 122(3168), 501 LP-504. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/122/3168/501.abstract>
- Eccleston, A., DeWitt, N., Gunter, C., Marte, B., & Nath, D. (2007). Epigenetics. *Nature*, 447(7143), 395–395. <http://doi.org/10.1038/447395a>
- Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., & Chakraborty, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12(2), 241–253. [http://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90371-X](http://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90371-X)
- Edwards, J. H., Harnden, D. G., Cameron, A. H., Crosse, V. M., & Wolff, O. H. (1960). A new trisomic syndrome. *Lancet (London, England)*, 1(7128), 787–790.
- Egilmez, O. K., & Kalcioğlu, M. T. (2016). Genetics of Nonsyndromic Congenital Hearing Loss. *Scientifica*, 2016, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2016/7576064>
- Eiberg, H. (1973). G, R and C banding patterns of human chromosomes produced by heat treatment in organic and inorganic salt solutions. *Clinical Genetics*, 4(6), 556–562.
- Elger, B. S. (2010). *Ethical, legal and social issues in the genetic testing of minors. Issues in clinical child psychology*. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-5800-6_20
- Ellard, S., Charlton, R., Yau, M., Gokhale, D., & Taylor, G. R. (2009). Practice guidelines Interpretation Sanger Sequencing Analysis and. *Clinical Molecular Genetics Society ,CMGS*, 4.
- Emery, A. E. . H. (1989). Joseph Adams (1756-1818). *Journal of Medical Genetics*, (26), 116–118.
- Erlich, H. (2012). HLA DNA typing: Past, present, and future. *Tissue Antigens*, 80(1), 1–11. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2012.01881.x>

- Escajedo, L., & Epifanio, S. A. N. (2013). Identidad genética y libertad de ciencia. *Anuario de La Facultad de Derecho de La Universidad Autonoma de Madrid*, 17(1), 39–74.
- Escribano R., G., Castillo T., S., Daher N., V., Salazar C., S., & Tobella P., L. (2009). Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 20, 20–27.
- España, M., Benavidez, J., & Uribe, A. (2010). El rol de la creatinuria en los estudios de tamizaje para errores innatos del metabolismo: un estudio retrospectivo. *Revista de La Asociacion Colombiana de Ciencias Biologicas*, 22(1), 67–68.
- Estrada-cuzcano, A. (2006). Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Rev. Peru. Biol.*, 12(3), 349–358.
- Eto, K., Iwatsuki, M., Watanabe, M., Ida, S., Ishimoto, T., Iwagami, S., ... Baba, H. (2014). The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab. *Annals of Surgical Oncology*, 21(October 2013), 343–50.
<http://doi.org/10.1245/s10434-013-3325-7>
- Etzioni, A., Britain, G., & Milunsky, A. (1976). Issues of public policy in the USA raised by amniocentesis'. *Journal of Medical Ethics*, 2, 8–11.
- European Society of Radiology. (2012). the Story of Radiology. *International Day of Radiology*, 1, 96. Retrieved from http://www.bshr.org.uk/The_Story_of_Radiology_Vol1.pdf
- Evans, M., Bergum, V., Bamforth, S., & MacPhail, S. (2004). Relational ethics and genetic counseling. *Nursing Ethics*, 11(5), 459–471. <http://doi.org/10.1191/0969733004ne724oa>
- Fakruddin, M., & Chowdhury, A. (2012). Pyrosequencing-an alternative to traditional Sanger sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(1), 14–20.

<http://doi.org/10.3844/ajbb.2012.14.20>

Fan, Y. S., Siu, V. M., Jung, J. H., & Xu, J. (2000). Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. *Genetic Testing*, 4(1), 9–14.

<http://doi.org/10.1097/00125817-200001000-00063>

Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews. Cancer*, 4(2), 143–153. <http://doi.org/10.1038/nrc1279>

Feng, S., Zhou, L., Huang, C., Xie, K., & Nice, E. C. (2015). Interactomics: toward protein function and regulation. *Expert Review of Proteomics*, 12(1), 37–60.

<http://doi.org/10.1586/14789450.2015.1000870>

Fernandez-Mercado, M., Manterola, L., Larrea, E., Goicoechea, I., Arestin, M., Armesto, M., ...

Lawrie, C. H. (2015). The circulating transcriptome as a source of non-invasive cancer biomarkers: Concepts and controversies of non-coding and coding RNA in body fluids. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(10), 2307–2323. <http://doi.org/10.1111/jcmm.12625>

Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., ... Greco, E. (2014).

Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human Reproduction*, 29(12), 2802–2813. <http://doi.org/10.1093/humrep/deu277>

Fischel-Ghodsian, N. (2005). Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics*, 6, 27–36. <http://doi.org/10.1517/14622416.6.1.27>

Fischer, S. G., & Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80, 1579–1583.

- Fisher, D. A., Dussault, J. H., Foley, T. P., Klein, A. H., LaFranchi, S., Larsen, P. R., ... Walfish, P. G. (1979). Screening for congenital hypothyroidism: Results of screening one million North American infants. *The Journal of Pediatrics*, *94*(5), 700–705. [http://doi.org/10.1016/S0022-3476\(79\)80133-X](http://doi.org/10.1016/S0022-3476(79)80133-X)
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. a, Kirkness, E. F., Kerlavage, a R., ... Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, N.Y.)*, *269*, 496–512. <http://doi.org/10.1126/science.7542800>
- Florell, S. R., Coffin, C. M., Holden, J. a, Zimmermann, J. W., Gerwels, J. W., Summers, B. K., ... Leachman, S. a. (2001). Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *14*(2), 116–128. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3880267>
- Forlenza, G. P., Calhoun, A., Beckman, K. B., Halvorsen, T., Hamdoun, E., Zierhut, H., ... Petryk, A. (2015). Next generation sequencing in endocrine practice. *Molecular Genetics and Metabolism*, *115*(2–3), 61–71. <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.05.002>
- Forli, F., Passetti, S., Mancuso, M., Seccia, V., Siciliano, G., Nesti, C., & Berrettini, S. (2007). Mitochondrial syndromic sensorineural hearing loss. In *Bioscience Reports* (Vol. 27, pp. 113–123). <http://doi.org/10.1007/s10540-007-9040-5>
- Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A., & Kallioniemi, O. P. (1997). Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends in Genetics*, *13*(10), 405–409. [http://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01244-4](http://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01244-4)

- Foster, A., & Laurin, N. (2012). Development of a fast PCR protocol enabling rapid generation of AmpF&STR® Identifiler® profiles for genotyping of human DNA. *Investigative Genetics*, 3, 6. <http://doi.org/10.1186/2041-2223-3-6>
- Foster, J. M., Oumie, A., Togneri, F. S., Vasques, F. R., Hau, D., Taylor, M., ... Brew, F. (2015). Cross-laboratory validation of the OncoScan® FFPE Assay, a multiplex tool for whole genome tumour profiling. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 5. <http://doi.org/10.1186/s12920-015-0079-z>
- Francès, F., Castelló, A., & Verdú, F. (2008). El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: Métodos y posibles fuentes de error. *Cuadernos de Medicina Forense*. <http://doi.org/10.4321/S1135-76062008000200002>
- Franco Vera, L. (2009). Enfermedades Epigenéticas : Desde El Cáncer Hasta La. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat.*, 103(1), 79–96.
- Frese, K. S., Katus, H. A., & Meder, B. (2013). Next-Generation Sequencing: From Understanding Biology to Personalized Medicine. *BIOLOGY*, 2, 378–398. <http://doi.org/10.3390/biology2010378>
- Fu, Y., Wei, X., Tang, C., Li, J., Liu, R., Shen, A., & Wu, Z. (2013). Circulating microRNA-101 as a potential biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 6(6), 1811–1815. <http://doi.org/10.3892/ol.2013.1638>
- Fuenzalida C, J., & Carvajal C, J. A. (2014). Manejo de la embarazada con isoimmunización por anticuerpos irregulares. *Revista Chilena de Obstetricia Y Ginecología*, 79(4), 315–322. <http://doi.org/10.4067/S0717-75262014000400011>
- Gaib, J. N., Nassief, A. F., & Al-assi, A. H. (2011). Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole blood Abstract : Introduction : *Nucleic Acids Research*, 16, 15–17.

- Galan Gomez, E. (2010). Consejo Genético. *Protoc Diagn Ter Pediatr*, (1), 51–55.
- Galas, D. J., & McCormack, S. J. (2003). An historical perspective on Genomic Technologies. *Curr. Issues Mol. Biol*, 5, 123–128. <http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198566564.003.0012>
- Galván B., J. L. (2009). Pruebas de tamizaje. *Red de Comunicación E Integración Biomédica*, (Figura 1), 1–6. Retrieved from <http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB/MaterialesDidacticos/Monografas/Pruebas de Tamiz.pdf>
- García-Closas, M., Egan, K. M., Abruzzo, J., Newcomb, P. A., Titus-Ernstoff, L., Franklin, T., ... Rothman, N. (2001). Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 10(6), 687–696.
- García-García, G., Baux, D., Faugère, V., Moclyn, M., Koenig, M., Claustres, M., & Roux, A.-F. (2016). Assessment of the latest NGS enrichment capture methods in clinical context. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 20948. <http://doi.org/10.1038/srep20948>
- García-Giménez, J. L., Sanchis-Gomar, F., Lippi, G., Mena, S., Ivars, D., Gomez-Cabrera, M. C., ... Pallardó, F. V. (2012). Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, 413(19–20), 1576–1582. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2012.05.021>
- García, L., Guglielmo, R., & Illa, L. (2010). Síndrome de MELAS: TC y RM como herramienta diagnóstica no invasiva. *Rev. Argent. Radiol*, 74(4), 379–383. Retrieved from es
- García, M. M., Martínez, F. J. F., & Barreiro, E. (2016). Repercusión clínica de las anomalías cromosómicas. *An Pediatr (Barc)*, 61(3), 236–241.
- García Quintero, N. V., Chavez Guerrero, C., & Miranda del Olmo, H. (2003). Un caso de trisomía 13 con una cardiopatía compleja. *Revista Mexicana de Pediatría*, 70(3), 139–142.

- Garini, Y., Macville, M., Du Manoir, S., Buckwald, R. A., Lavi, M., Katzir, N., ... Ried, T. (1996). Spectral karyotyping. *Bioimaging*, 4(2), 65–72. [http://doi.org/10.1002/1361-6374\(199606\)4:2<65::AID-BIO4>3.0.CO;2-D](http://doi.org/10.1002/1361-6374(199606)4:2<65::AID-BIO4>3.0.CO;2-D)
- Garrido Garrido, B., & Barcía González, M. (2011). Microscopio de Leeuwenhoek. *Revista Eureka Sobre Enseñanza Y Divulgación de Las Ciencias*, 8, 487–490. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10498/14555>
- Garrod, A. E., Oxon, M. D., & Lond, F. R. C. P. (1996). THE INCIDENCE OF ALKAPTONURIA : A STUDY IN CHEMICAL INDIVIDUALITY. *Molecular Medicine*, 2(3), 1616–1620.
- Ge, J., Eisenberg, A., & Budowle, B. (2012). Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investigative Genetics*. <http://doi.org/10.1186/2041-2223-3-1>
- Gebel, H. M., Liwski, R. S., & Bray, R. a. (2013). Technical aspects of HLA antibody testing. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 18(4), 455–62. <http://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32836361f1>
- Gebhard, C., Schwarzfischer, L., Pham, T., Schilling, E., Klug, M., Andreesen, R., & Rehli, M. (2006). Genome-Wide Profiling of CpG Methylation Identifies Novel Targets of Aberrant Hypermethylation in Myeloid Leukemia, (12), 6118–6129. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0376>
- Geigl, J. B., Obenauf, A. C., Schwarzbraun, T., & Speicher, M. R. (2008). Defining “chromosomal instability.” *Trends in Genetics*, 24(2), 64–69. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.006>
- Geison, G. L. (1969). Darwin and heredity: the evolution of his hypothesis of pangenesis. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 24(4), 375–411.

- GeneDx. (2013). *Prenatal FISH Analysis in 22q11 . 2 Deletion Syndrome*.
- Gerami, P., & Zembowicz, A. (2011). Update on fluorescence in situ hybridization in melanoma: State of the art. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*.
<http://doi.org/10.1016/j.yoph.2012.01.006>
- Gersen, S. L., & Keagle, M. B. (2005). *The Principles of clinical cytogenetics*. (S. L. Gersen & M. B. Keagle, Eds.) (second edit). New Jersey: Humana Press.
- Geserick, G., & Wirth, I. (2012). Genetic Kinship Investigation from Blood Groups to. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, (39), 163–175. <http://doi.org/10.1159/000338850>
- Gil, M. M., Akolekar, R., Quezada, M. S., Bregant, B., & Nicolaides, K. H. (2014). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: Meta-analysis. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35(3), 156–173. <http://doi.org/10.1159/000358326>
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G., & Veltman, J. A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*, 20(5), 490–497.
<http://doi.org/10.1038/ejhg.2011.258>
- Gill, P., Jeffreys, A., & Werrett, D. (1985). Forensic application of DNA “fingerprints.” *Nature*, 318(12), 577–579. <http://doi.org/10.1038/318577a0>
- Giraldo, A. (2006). Estándares Básicos para los Laboratorios de Pruebas de Paternidad en Colombia, 2005. *Rev. Salud Publica*, 8(2), 229–237.
- Godard, B., Raeburn, S., Pembrey, M., Bobrow, M., Farndon, P., & Aymé, S. (2003). Genetic information and testing in insurance and employment: technical, social and ethical issues. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 11 Suppl 2, S123–S142.
<http://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201117>

Goffeau, A., Aert, R., Angostini-Carbone, M. L., Ahmed, A., Aigie, M., Alberghina, L., & Albermann, K. (1997). The Yeast Genome. *Nature Genetics*, *387*(6632S), 1–106.

<http://doi.org/10.1016/j.gene.2006.08.022>.Protein

Gómez Sánchez, Y. (2011). Dignidad y autodeterminación física como fundamento del estatuto del paciente. *Acta Bioethica*, *17*(1), 37–46. <http://doi.org/10.4067/S1726-569X2011000100005>

Goodman, B. E., & Percy, W. H. (2005). CFTR in cystic fibrosis and cholera: from membrane transport to clinical practice. *Advances in Physiology Education*, *29*(2), 75–82.

<http://doi.org/10.1152/advan.00035.2004>

Gottesfeld, K. R., Thompson, H. E., Holmes, J. H., & Taylor, E. S. (1966). Ultrasonic placentography--a new method for placental localization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *96*(4), 538–547.

Gray, G., Claridge, P., Jenkinson, L., & Green, A. (2007). Quantitation of urinary glycosaminoglycans using dimethylene blue as a screening technique for the diagnosis of mucopolysaccharidoses: an evaluation. *Annals of Clinical Biochemistry*, *44*(Pt 4), 360–3.

<http://doi.org/10.1258/000456307780945688>

Greek, R., Pippus, A., & Hansen, L. A. (2012). The Nuremberg Code subverts human health and safety by requiring animal modeling. *BMC Medical Ethics*. <http://doi.org/10.1186/1472-6939-13-16>

Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., Kalia, S. S., Korf, B. R., Martin, C. L., ... American College of Medical Genetics and Genomics. (2013). ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *15*(7), 565–74.

<http://doi.org/10.1038/gim.2013.73>

Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., Kalia, S. S., Korf, B. R., Martin, C. L., ... Biesecker, L. G. (2013).

ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine*, *15*(7), 565–574. <http://doi.org/10.1038/gim.2013.73>

Grosse, S. D., & Van Vliet, G. (2007). How many deaths can be prevented by newborn screening for

congenital adrenal hyperplasia? *Hormone Research*. <http://doi.org/10.1159/000098400>

Güemez-Sandoval, E. (2008). Hermann von Helmholtz y el oftalmoscopio. *Revista Mexicana de*

Oftalmologia, *82*(1), 62–64.

Hadi, I., Abdullah, M., Jaber, A., & Yoke, C. (2014). Genetic variation of twenty autosomal STR loci

and evaluate the importance of these loci for forensic genetic purposes, *13*(11), 1210–1218.

<http://doi.org/10.5897/AJB2013.12923>

Haeri, M., Gelowani, V., & Beaudet, A. L. (2016). Chromosomal microarray analysis, or comparative

genomic hybridization: A high throughput approach. *MethodsX*, *3*, 8–18.

<http://doi.org/10.1016/j.mex.2015.11.005>

Hall, M. J., Forman, A. D., Pilarski, R., Wiesner, G., & Giri, V. N. (2014). Gene panel testing for

inherited cancer risk. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*.

Hamerton, J. L., Jacobs, P. A., & Klinger, H. P. (1972). Paris Conference 1971: Standardization in

Human Cytogenetics. In *Standardization in Human Cytogenetics* (pp. 313–362).

Handyside, A. H., Harton, G. L., Mariani, B., Thornhill, A. R., Affara, N., Shaw, M.-A., & Griffin, D. K.

(2010). Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease

based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medical Genetics*,

47(10), 651–658. <http://doi.org/10.1136/jmg.2009.069971>

Handyside, a H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., & Winston, R. M. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*.

<http://doi.org/10.1097/00006254-199107000-00024>

Hardenbol, P., Yu, F., Belmont, J., MacKenzie, J., Bruckner, C., Brundage, T., ... Gibbs, R. A. (2005).

Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay. *Genome Research*, *15*(2), 269–275.

<http://doi.org/10.1101/gr.3185605>

Hares, D. R. (2015). Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International: Genetics*, *17*, 33–34.

<http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.006>

Harismendy, O., & Frazer, K. A. (2009). Method for improving sequence coverage uniformity of targeted genomic intervals amplified by LR-PCR using Illumina GA sequencing-by-synthesis technology. *BioTechniques*, *46*(3), 229–231. <http://doi.org/10.2144/000113082>

Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012a). General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics, (29), 7–25.

Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012b). Specific Constitutional Cytogenetic Guidelines. *European Cytogeneticists Association Newsletter*, (30), 11–19.

Hawkins, R. D., Hon, G., & Ren, B. (2012). Next-Generation Genomics: an Integrative Approach.

Nat Rev Genet, *11*(7), 476–486. <http://doi.org/10.1038/nrg2795>.Next-Generation

Hayden, E. C. (2014). The \$1,000 genome. *Nature*, *507*, 295.

<http://doi.org/10.1038/nature.2014.14530>

- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, *107*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Heeley, A. F., Heeley, M. E., King, D. N., Kuzemko, J. A., & Walsh, M. P. (1982). Screening for cystic fibrosis by dried blood spot trypsin assay. *Archives of Disease in Childhood*, *57*(1), 18–21.
Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hershey, A. D., & Chase, M. (1952). INDEPENDENT FUNCTIONS OF VIRAL PROTEIN AND NUCLEIC ACID IN GROWTH OF BACTERIOPHAGE. *The Journal of General Physiology*, *36*(1), 39–56.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2147348/>
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford. *Clinical Chemistry*, *48*(10), 1819–1827.
<http://doi.org/10.1038/scientificamerican0376-108>
- Hicks, E. J., & Hughes, B. J. (1975). Comparison of electrophoresis on citrate agar, cellulose acetate, or starch for hemoglobin identification. *Clinical Chemistry*, *21*(8), 1072–1076.
- Hilgert, N., Smith, R. J. H., & Van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.08.002>
- Hiroaki, N., Koji, F., Tetsushi, K., Kazumasa, S., Hiroaki, N., & Kazuyuki, S. (2015). Approaches for identifying multiple-SNP haplotype blocks for use in human identification. *Legal Medicine*, *17*(5), 415–420. <http://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.06.003>

- Hobbins, J. C., Grannum, P. A., Berkowitz, R. L., Silverman, R., & Mahoney, M. J. (1979). Ultrasound in the diagnosis of congenital anomalies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *134*(3), 331–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/453266>
- Hoffman, J. D., Park, J. J., Schreiber-Agus, N., Kornreich, R., Tanner, A. K., Keiles, S., ... Heim, R. A. (2014). The Ashkenazi Jewish carrier screening panel: Evolution, status quo, and disparities. *Prenatal Diagnosis*, *34*(12), 1161–1167. <http://doi.org/10.1002/pd.4446>
- Holtzman, N. A. (1999). Promoting safe and effective genetic tests in the United States: Work of the Task Force on Genetic Testing. *Clinical Chemistry*.
- Hosoi, E. (2008). Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *The Journal of Medical Investigation : JMI*, *55*(3–4), 174–182. <http://doi.org/10.2152/jmi.55.174>
- Hosomichi, K., Shiina, T., Tajima, A., & Inoue, I. (2015). The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *Journal of Human Genetics*, *60*(11), 665–73. <http://doi.org/10.1038/jhg.2015.102>
- How, A., Myrtue, H., & Tost, J. (2012). Biochimie DNA methylation based biomarkers : Practical considerations and applications. *Biochimie*, *94*(11), 2314–2337. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.014>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. <http://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., ... Marsh, C. B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*, *3*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>

- Huo, L. A., Yang, J., & Zhang, C. (2014). Regional difference of genetic factors for congenital cataract. The results of congenital cataract screening under normal pupil conditions for infants in Tianjin city. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *18*(3), 426–430.
- Huse, S. M., Huber, J. a, Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Welch, D. M. (2007). Accuracy and quality of massively-parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*, *8*(7), R143.
<http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r143>
- Illig, R., Torresani, T., & Sobradillo, B. (1977). Early detection of neonatal hypothyroidism by serial TSH determination in dried blood. Six months experience with a reliable, efficient and inexpensive method. *Helvetica Paediatrica Acta*, *32*(4–5), 289–297. Retrieved from
<http://europepmc.org/abstract/MED/617976>
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal*, *5*, 6–13. <http://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500285>
- International, T., & Consortium, H. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, *426*(6968), 789–796. <http://doi.org/10.1038/nature02168>
- James, M. L., & Gambhir, S. S. (2012). A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.*, *92*(2), 897–965. <http://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010>
- Jeffreys, A. J. (2005). Genetic fingerprinting. *Nature Medicine*, *11*(10), 1035–1039.
<http://doi.org/10.1038/nm1005-1035>
- Jiang, F., Pan, Z., Xu, K., Tian, L., Xie, Y., Zhang, X., ... Li, Y. (2016). Screening of *ABCA4* Gene in a Chinese Cohort With Stargardt Disease or Cone-Rod Dystrophy With a Report on 85 Novel

Mutations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(1), 145.

<http://doi.org/10.1167/iovs.15-18190>

Jiang, T., Tan, M.-S., Tan, L., & Yu, J.-T. (2014). Application of next-generation sequencing technologies in Neurology. *Annals of Translational Medicine*, 2(12), 125.

<http://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.11.11>

Jiménez-escrig, A., Gobernado, I., & Sánchez-herranz, A. (2012). Secuenciación de genoma completo : un salto cualitativo en los estudios genéticos, 54(11), 692–698.

John, E. M., Miron, A., Gong, G., Phipps, A. I., Felberg, A., Li, F. P., ... Whittemore, A. S. (2007). Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 298(24), 2869–2876.

[http://doi.org/10.1016/S0084-3954\(08\)79042-0](http://doi.org/10.1016/S0084-3954(08)79042-0)

Júdez, J., Nicolás, P., Delgado, M. T., Hernando, P., Zarco, J., & Ganollers, S. (2002). La confidencialidad en la práctica clínica : historia clínica y gestión de la información. *Med Clin (Barc)*, 118(1), 18–37.

Jukic, I., Bingulac-Popovic, J., Dogic, V., Babic, I., Culej, J., Tomicic, M., ... Baliija, M. (2009). ABO blood groups and genetic risk factors for thrombosis in Croatian population. *Croatian Medical Journal*, 50(6), 550–558. <http://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.550>

Kalia, S. S., Adelman, K., Bale, S. J., Chung, W. K., Eng, C., Evans, J. P., ... Miller, D. T. (2017). Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 19(2), 249–255.

<http://doi.org/10.1038/gim.2016.190>

- Karabuva, S., Carević, V., Radić, M., & Fabijanić, D. (2013). The association of ABO blood groups with extent of coronary atherosclerosis in Croatian patients suffering from chronic coronary artery disease. *Biochemia Medica*, 23(3), 351–359. <http://doi.org/10.11613/BM.2013.043>
- Katsanis, S. H., & Wagner, J. K. (2013). Characterization of the Standard and Recommended CODIS Markers*. *Journal of Forensic Sciences*, 58(SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02253.x>
- Kayser, M., Caglià, A., Corach, D., Fretwell, N., Gehrig, C., Graziosi, G., ... Roewer, L. (1997). Evaluation of Y-chromosomal STRs: A multicenter study. *International Journal of Legal Medicine*, 110(3), 125–133. <http://doi.org/10.1007/s004140050051>
- Kehler, L., Biro, O., Lazar, L., Rigo, J. J., & Nagy, B. (2015). Elevated hsa-miR-99a levels in maternal plasma may indicate congenital heart defects. *Biomedical Reports*, 3(6), 869–873. <http://doi.org/10.3892/br.2015.510>
- Khalil, A. (2006). Screening for Down syndrome. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine of India*, 56(3), 205–211. <http://doi.org/10.1016/j.ogrm.2012.01.006>
- Kharrazi, M., Yang, J., Bishop, T., Lessing, S., Young, S., Graham, S., ... Feuchtbaum, L. (2015). Newborn Screening for Cystic Fibrosis in California. *Pediatrics*, 136(6), 1062–1072. <http://doi.org/10.1542/peds.2015-0811>
- Khosa, S. M., Usman, M., Moinuddin, M., Mehmood, H. O., & Qamar, K. (2015). Comparative analysis of cellulose acetate hemoglobin electrophoresis and high performance liquid chromatography for quantitative determination of hemoglobin A2. *Blood Research*, 50(1), 46–50. <http://doi.org/10.5045/br.2015.50.1.46>
- Kim, C. H., Kim, H. K., Rettig, R. L., Kim, J., Lee, E. T., Aprelikova, O., ... Green, J. E. (2011). miRNA

- signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy. *BMC Medical Genomics*, 4(1), 79. <http://doi.org/10.1186/1755-8794-4-79>
- Kim, H.-J., Oh, K.-W., Kwon, M.-J., Oh, S.-I., Park, J.-S., Kim, Y.-E., ... Kim, S. H. (2016). Identification of mutations in Korean patients with amyotrophic lateral sclerosis using multigene panel testing. *Neurobiology of Aging*, 37, 209.e9-209.e16. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.012>
- Kim, J. E., Kim, B. R., Woo, K. S., Kim, J. M., Park, J. I., & Han, J. Y. (2011). Comparison of capillary electrophoresis with cellulose acetate electrophoresis for the screening of hemoglobinopathies. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(4), 238–243. <http://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.238>
- Kim, J. J., Han, B. G., Lee, H. I., Yoo, H. W., & Lee, J. K. (2010). Development of SNP-based human identification system. *International Journal of Legal Medicine*, 124(2), 125–131. <http://doi.org/10.1007/s00414-009-0389-9>
- Kimpton, C. P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E. S., & Adams, M. (1993). Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *Genome Research*. <http://doi.org/10.1101/gr.3.1.13>
- Kimpton, C. P., Oldroyd, N. J., Watson, S. K., Frazier, R. R., Johnson, P. E., Millican, E. S., ... Gill, P. (1996). Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis*, 17(8), 1283–1293. <http://doi.org/10.1002/elps.1150170802>
- Kleman, K. M., Vichinsky, E., & Lubin, B. H. (1989). Experience with Newborn Screening Using Isoelectric Focusing. *Pediatrics*, 83, 852–854.

- Klinefelter, H. F. (1986). Klinefelter's syndrome: historical background and development. *Southern Medical Journal*, 79(9), 1089–1093.
- Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., & Mardis, E. R. (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>
- Koide, K., Sakakura, C., Takahashi, T., Abe, T., & Inazawa, J. (1997). Fluorescence in situ hybridization (FISH) as a tool for cancer diagnosis. *Biotherapy*, 11, 1146–1151.
- Kolialexi, a, Tsangaris, G. T., Kitsiou, S., Kanavakis, E., & Mavrou, a. (2005). Impact of cytogenetic and molecular cytogenetic studies on hematologic malignancies. *Anticancer Research*, 25(4), 2979–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080555>
- Kotsopoulou, I., Tsoplou, P., Mavrommatis, K., & Kroupis, C. (2015). Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis. *Diagnosis*, 0(0), 141–158.
<http://doi.org/10.1515/dx-2015-0002>
- Kucherlapati, R. (2013). *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00004-5>
- Kurian, A. W., Hare, E. E., Mills, M. A., Kingham, K. E., McPherson, L., Whittemore, A. S., ... Ford, J. M. (2014). Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *Journal of Clinical Oncology*, 32(19), 2001–2009.
<http://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.6607>
- Kuska, B. (1998). Beer, Bethesda, and biology: how "genomics" came into being. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(2), 93. <http://doi.org/10.1093/jnci/90.2.93>

- Lai, E. (2001). Application of SNP Technologies in Medicine : Lessons Learned and Future Challenges. *Genome Research*, 11, 927–929. <http://doi.org/10.1101/gr.192301>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... International Human Genome Sequencing, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921. <http://doi.org/10.1038/35057062>
- Langer, P. R., Waldrop, A. A., & Ward, D. C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 6633–6637. <http://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6633>
- Lanman, R. B., Mortimer, S. A., Zill, O. A., Sebisano, D., Lopez, R., Blau, S., ... Talasaz, A. A. (2015). Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS ONE*, 10(10), 1–27. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140712>
- Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., van de Rijke, F. M., Dragowska, V., Little, M. T., Dirks, R. W., ... Tanke, H. J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 5(5), 685–691.
- Lapin, V., Mighion, L. C., da Silva, C. P., Cuperus, Y., Bean, L. J. H., & Hegde, M. R. (2016). Regulating whole exome sequencing as a diagnostic test. *Human Genetics*, 135(6), 655–673. <http://doi.org/10.1007/s00439-016-1677-3>
- Lavori, P. W., Ph, D., Krause-steinrauf, H., S, M., Brophy, M., D, M., ... A, M. (2002). Principles , organization , and operation of a DNA bank for clinical trials : a Department of Veterans Affairs cooperative study, 23, 222–239.

- Lee, B., Mazar, J., Aftab, M. N., Qi, F., Shelley, J., Li, J., & Govindarajan, S. (2014). Long Noncoding RNAs as Putative Biomarkers for Prostate Cancer Detection. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *16*(6), 615–626. <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.06.009>
- Lee, C. N., Lin, S. Y., Lin, C. H., Shih, J. C., Lin, T. H., & Su, Y. N. (2012). Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: A cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2012.03279.x>
- Lee, R. C. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*, *75*, 843–854. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Leikola, J., Fudenberg, H. H., Kasukawa, R., & Milgrom, F. (1972). A New Genetic Polymorphism of Human Serum : α_2 Macroglobulin (ALrM). *American Journal of Human Genetics*, *24*, 134–144.
- Lejeune, J., Lafurcade, J., Berger, R., Vialatte, J., Boeswillwald, M., Seringe, P., & Turpin, R. (1963). [3 CASES OF PARTIAL DELETION OF THE SHORT ARM OF A 5 CHROMOSOME]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, *257*, 3098–3102.
- Lenoir, N. (1997). UNESCO, genetics, and human rights. *Kennedy Institute of Ethics Journal*, *7*(1), 31–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11654621>
- Lerner, N. B., Platania, B. L., & LaBella, S. (2009). Newborn sickle cell screening in a region of Western New York State. *The Journal of Pediatrics*, *154*(1), 121–5. <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.06.039>
- Levinson, G., Keyvanfar, K., Wu, J. C., Fugger, E. F., Fields, R. A., Harton, G. L., ... Black, S. H. (1995). DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for

the prevention of X-linked disease. *Molecular Human Reproduction*, 1(2), 59–62.

<http://doi.org/10.1093/molehr/1.2.59>

Li, Y., Korol, A., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites : genomic distribution , putative functions and mutational mechanisms : a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453–2465.

Li, Y., Sahni, N., & Yi, S. (2016). Comparative analysis of protein interactome networks prioritizes candidate genes with cancer signatures, (2007), 1–9.

<http://doi.org/10.18632/oncotarget.12879>

Li, Y., Wenzel, F., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2006). Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: Influence of size fractionation. *Electrophoresis*, 27(19), 3889–3896. <http://doi.org/10.1002/elps.200600084>

Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clinical Chemistry*, 50(6), 1002–1011. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2003.029835>

Liao, G. J. W., Chan, K. C. A., Jiang, P., Sun, H., Leung, T. Y., Chiu, R. W. K., & Dennis Lo, Y. M. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS ONE*, 7(5), 1–7.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0038154>

Lin, X., Lo, H. C., Wong, D. T. W., & Xiao, X. (2015). Noncoding RNAs in human saliva as potential disease biomarkers. *Frontiers in Genetics*, 6(MAY), 1–6.

<http://doi.org/10.3389/fgene.2015.00175>

Lincoln, S. E., Kobayashi, Y., Anderson, M. J., Yang, S., Desmond, A. J., Mills, M. A., ... Ellisen, L. W. (2015). A systematic comparison of traditional and multigene panel testing for hereditary

- breast and ovarian cancer genes in more than 1000 patients. *Journal of Molecular Diagnostics*, 17(5), 533–544. <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.009>
- Lind, G. E., Danielsen, S. a, Ahlquist, T., Merok, M. a, Andresen, K., Skotheim, R. I., ... Lothe, R. a. (2011). Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. *Molecular Cancer*, 10, 85. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-10-85>
- Linder, M. W., & Valdes, R. (2001). Genetic mechanisms for variability in drug response and toxicity. *Journal of Analytical Toxicology*, 25(5), 405–413.
- Lindor, N. M., McMaster, M. L., Lindor, C. J., & Greene, M. H. (2008). Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes - Second Edition. *JNCI Monographs*, 2008(38), 3–93. <http://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgn001>
- Lindpaintner, K. (2002). Pharmacogenetics and the future of medical practice. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54(2), 221–230. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2002.01630.x>
- Liu, K., Qian, T., Tang, L., Wang, J., Yang, H., & Ren, J. (2012). Decreased expression of microRNA let-7i and its association with chemotherapeutic response in human gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 10(1), 225. <http://doi.org/10.1186/1477-7819-10-225>
- Liu, Y., & Li, X. (2016). Darwin's Pangenesis and molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 18(9), 506–508. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.07.002>
- Lo, D., Tein, M., Lau, T., & Haines, C. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American Journal of Human Genetics*, 62(4), 768–775. <http://doi.org/10.1086/301800>
- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W. G., & Wainscoat,

- J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076), 485–487. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
- Lo, Y. M., Hjelm, N. M., Fidler, C., Sargent, I. L., Murphy, M. F., Chamberlain, P. F., ... Wainscoat, J. S. (1998). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England Journal of Medicine*, 339(24), 1734–1738. <http://doi.org/10.1056/NEJM199812103392402>
- Lo, Y. M., Lo, E. S., Watson, N., Noakes, L., Sargent, I. L., Thilaganathan, B., & Wainscoat, J. S. (1996). Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*, 88(11), 4390–4395. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/88/11/4390.abstract>
- Lockwood, W. W., Chari, R., Chi, B., & Lam, W. L. (2005). Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *European Journal of Human Genetics*, 14(2), 139–148. <http://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201531>
- lopez, N. (2013). *El derecho a la información y el derecho a la verdad a partir del caso del Banco Nacional de Datos Genéticos argentino*. Universidad de Buenos Aires.
- Lu, X., Shaw, C. A., Patel, A., Li, J., Cooper, M. L., Wells, W. R., ... Ward, P. A. (2007). Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: Summary of 2513 postnatal cases. *PLoS ONE*, 2(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000327>
- Lupski, J. R., Reid, J. G., Gonzaga-Jauregui, C., Rio Deiros, D., Chen, D. C. Y., Nazareth, L., ... Gibbs, R. a. (2010). Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *The New England Journal of Medicine*, 362(13), 1181–1191. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0908094>

Luscombe, N. M., Greenbaum, D., & Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics ? An introduction and overview. *Yearbook of Medical Informatics*, 83–100.

<http://doi.org/10.1053/j.ro.2009.03.010>

Lynce, F., & Isaacs, C. (2016). How Far Do We Go With Genetic Evaluation ? Gene , Panel , and. *ASCO Eductional Book*. http://doi.org/10.14694/EDBK_160391

Ma, Q. F. B., Navarrete, P., Patricia, D., Vera, P., Roberto, B., & Alcívar, C. (2012). Síndromes de inestabilidad cromosómica asociados con inmunodeficiencia: Aspectos citogenéticos de importancia en el diagnóstico. *Pediatricas*, 21, 13–22.

Machado Filipe Brum. (2009). Genetic map of human x-linked microsatellites used in forensic practice. *FSI*, 2. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.10.006>

Maciel-guerra, A. T., Paulo, J. De, Santos, A. P., Guaragna-filho, G., Gabriel, J., & Andrade, R. (2012). The use of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of hidden mosaicism: apropos of a three cases of sex chromosome anomalies. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 56, 545–551.

Madisen, L., Hoar, D. I., Holroyd, C. D., Crisp, M., & Hodes, M. E. (1987). DNA banking: The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *American Journal of Medical Genetics*, 27(2), 379–390. <http://doi.org/10.1002/ajmg.1320270216>

Mahtani, M. M., & Willard, H. F. (1993). A polymorphic X-linked tetranucleotide repeat locus displaying a high rate of new mutation: implications for mechanisms of mutation at short tandem repeat loci. *Human Molecular Genetics*, 2(4), 431–437.

Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2008). Magnetic Activated Cell Sorting (MACS): Utility in assisted reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46(7), 491–497.

- Makrythanasis, P., Nelis, M., Santoni, F. A., Guipponi, M., Vannier, A., B??na, F., ... Antonarakis, S. E. (2014). Diagnostic Exome Sequencing to Elucidate the Genetic Basis of Likely Recessive Disorders in Consanguineous Families. *Human Mutation*, *35*(10), 1203–1210.
<http://doi.org/10.1002/humu.22617>
- Mallmann, C., Siemoneit, S., Schmiedel, D., Petrich, A., Gescher, D. M., Halle, E., ... Moter, A. (2010). Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: A pilot study. *Clinical Microbiology and Infection*, *16*, 767–773. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02936.x>
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. ., & Sharma, P. . (2009). High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *In Vitro*, *2*(November), 47–55. [http://doi.org/10.1016/S0969-6997\(11\)00073-1](http://doi.org/10.1016/S0969-6997(11)00073-1)
- Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., ... Turner, D. J. (2010). Target-enrichment strategies for next- generation sequencing. *Nature Methods*, *7*(2), 111–118. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1419>
- Manning, M., & Hudgins, L. (2010). Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *12*(11), 742–5.
<http://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181f8baad>
- Mark, H. F. (1994). Fluorescent in situ hybridization as an adjunct to conventional cytogenetics. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *24*(2), 153–163.
- Marodin, G., Braathen, J., Motta, L., Maria, L., & Santos, P. (2013). Brazilian guidelines for biorepositories and biobanks of human biological material ☆. *Rev Assoc Med Bras*, *59*(1), 72–77. [http://doi.org/10.1016/S2255-4823\(13\)70432-6](http://doi.org/10.1016/S2255-4823(13)70432-6)

- Martínez-Expósito, M. J., Méndez, J., & Pasantes, J. J. (1997). Analysis of NORs and NOR-associated heterochromatin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Chromosome Research*, *5*, 268–273.
- Martinez, F. D., Graves, P. E., Baldini, M., Solomon, S., & Erickson, R. (1997). Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *The Journal of Clinical Investigation*, *100*(12), 3184–8. <http://doi.org/10.1172/JCI119874>
- Martinez, J. Cesar. (2012). Biobanks A strict and essential strategy conservation of biological samples. *Acta Medica Colombiana*, *37*(3), 158–162.
- Mascarello, J. T., Hirsch, B., Kearney, H. M., Ketterling, R. P., Olson, S. B., Quigley, D. I., ... Wiktor, A. E. (2011). Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *13*, 667–675. <http://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182227295>
- Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J. C., Verhoeve, H. R., ... van der Veen, F. (2007). In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *The New England Journal of Medicine*, *357*(1), 9–17. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa067744>
- MATSUI, S.-I., & SASAKI, M. (1973). Differential Staining of Nucleolus Organisers in Mammalian Chromosomes. *Nature*, *246*(5429), 148–150. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/246148a0>
- McCready, M. E., Grimsey, A., Styer, T., Nikkel, S. M., & Bulman, D. E. (2007). A century later Farabee has his mutation. *Human Genetics*, *121*(1), 153. <http://doi.org/10.1007/s00439-006->

McEwen, J. E., & Reilly, P. R. (1994). A review of state legislation on DNA forensic data banking.

American Journal of Human Genetics, 54(6), 941–958.

McGregor, H. C. J., & Gunderman, R. B. (2011). X-ray crystallography and the elucidation of the structure of DNA. *American Journal of Roentgenology*, 196(6), 689–692.

<http://doi.org/10.2214/AJR.10.5479>

McGuire, A. L., McCullough, L. B., & Evans, J. P. (2013). The Indispensable role of professional judgment in genomic medicine. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 309(14), 1465–1466. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>.Investigations

Megarbane, A., Ravel, A., Mircher, C., Sturtz, F., Grattau, Y., Rethore, M., ... Mobley, W. C. (2009).

The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21 : The past , present , and future of research and treatment of Down syndrome. *Genetics in Medicine*, 11(9), 611–616.

<http://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181b2e34c>

Menkes, J. H. (2003). *A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases*. *European Journal of Paediatric Neurology* (Vol. 7). [http://doi.org/10.1016/S1090-3798\(03\)00074-6](http://doi.org/10.1016/S1090-3798(03)00074-6)

Meny, G. M. (2010). The Duffy blood group system: A review. *Immunohematology*, 26(2), 51–56.

<http://doi.org/10.1159/000219636>

Mertens G., Vandenberghe A., & M. L. (1999). Paternity Test: a review of theoretical and practical issues. *Arch Public Heald*, 57(4), 131–140.

Mery, L., Parra, B., Gollop, T. R., & Naccache, N. (n.d.). Hibridación in situ por fluorescencia (fish) en muestras de líquido amniótico obtenido por amniocentesis precoz, 129–137.

Metaxotou, C., Kalpini-Mavrou, a, Panagou, M., & Tsenghi, C. (1978). Polymorphism of

chromosome 9 in 600 Greek subjects. *American Journal of Human Genetics*, 30(1), 85–89.

Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., ... Ledbetter, D. H. (2010). Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *American Journal of Human Genetics*, 86(5), 749–764. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006>

Ministerio de la Protección Social. Código De Infancia Y Adolescencia, 1 Noviembre 100 (2006). Colombia. Retrieved from <http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/PortalICBF/Bienestar/LeyInfanciaAdolescencia/SobreLaLey/CODIGOINFANCIALey1098.pdf>

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución Numero 8430 De 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud., 1993 Ministerio De Salud Resolución 1–19 (1993). <http://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>

Ministry of Health. Guidelines for the Use of Human Tissue for Future Unspecified Research Purposes (2007). Wellington, New Zealand.

Ministry of Social Affairs and Health. Act on the Medical Use of human Organs, Tissues and Cells (2012). Finland.

Mirabet, V., Alvarez, M., Solves, P., Ocete, D., & Gimeno, C. (2012). Use of liquid nitrogen during storage in a cell and tissue bank: Contamination risk and effect on the detectability of potential viral contaminants. *Cryobiology*, 64(2), 121–123. <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.12.005>

Mitra, R., Mishra, N., & Rath, G. P. (2014). Blood groups systems. *Indian Journal of Anaesthesia*,

58(5), 524–528. <http://doi.org/10.4103/0019-5049.144645>

Mohnike, K., Blankenstein, O., Minn, H., Mohnike, W., Fuchtnner, F., & Otonkoski, T. (2008). [18F]-

DOPA positron emission tomography for preoperative localization in congenital

hyperinsulinism. *Hormone Research*, 70(2), 65–72. <http://doi.org/10.1159/000137655>

Monaghan, K. G., Feldman, G. L., Palomaki, G. E., & Spector, E. B. (2008). Technical standards and

guidelines for reproductive screening in the Ashkenazi Jewish population. *Genetics in*

Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics, 10(1), 57–72.

<http://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31815f6eac>

Moore, C. M., & Best, R. G. (2001). Chromosome Preparation and Banding. *Encyclopedia of Life*

Sciences, 1–7.

Morabia, A., & Zhang, F. F. (2004). History of medical screening: from concepts to action.

Postgraduate Medical Journal, 80(946), 463–9. <http://doi.org/10.1136/pgmj.2003.018226>

Morris, C. A., & Mervis, C. B. (2000). Williams syndrome and related disorders. *Annu Rev Genomics*

Hum Genet, 1, 461–484. Retrieved from

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation
&list_uids=11701637](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11701637)

Motulsky, A. G., & Qi, M. (2007). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *Journal*

of Zhejiang University SCIENCE B, 7(2), 169–170. <http://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0169>

Mousallem, T., Urban, T. J., McSweeney, K. M., Kleinstein, S. E., Zhu, M., Adeli, M., ... Goldstein, D.

B. (2015). Clinical application of whole-genome sequencing in patients with primary

immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(2), 476–479.

<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.02.040>

- Mulero, J. J., Chang, C. W., Calandro, L. M., Green, R. L., Li, Y., Johnson, C. L., & Hennessy, L. K. (2006). Development and validation of the AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Yfiler $^{\text{TM}}$ PCR amplification kit: A male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. In *Journal of Forensic Sciences* (Vol. 51, pp. 64–75). <http://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2005.00016.x>
- Muller, H. J. (1927). ARTIFICIAL TRANSMUTATION OF THE GENE. *Science (New York, N.Y.)*, 66(1699), 84–87. <http://doi.org/10.1126/science.66.1699.84>
- Mullis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, 48(8), 579–582.
- Mulot, C., Stücker, I., Clavel, J., Beaune, P., & Loriot, M. A. (2005). Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: Comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2005(3), 291–296. <http://doi.org/10.1155/JBB.2005.291>
- Mumford, A. D., Ackroyd, S., Alikhan, R., Bowles, L., Chowdary, P., Grainger, J., ... O'Connell, N. (2014). Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders. *British Journal of Haematology*, 167(3), 304–326. <http://doi.org/10.1111/bjh.13058>
- Mussavi, M., Asadollahi, K., Janbaz, F., Mansoori, E., & Abbasi, N. (2014). The evaluation of red reflex sensitivity and specificity test among neonates in different conditions. *Iranian Journal of Pediatrics*, 24(6), 697–702.
- Muyzer, G., Waal, E. C. D. E., & Uitierlinden, A. G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.

Nacional, M. de la P. S. y U. (2007). *Implicaciones éticas, jurídicas y médicas de la sentencia C-355 de la corte constitucional: Un avance para el ejercicio de los derechos humanos, sexuales y reproductivos de las colombianas.*

Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23(38), 6445–6470. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>

National Institutes of Health. (1979). The Belmont Report. *The Belmont Report Ethical Principles and Guidelines for the Protection of Human Subjects of Research*, 4–6. <http://doi.org/10.1002/9780471462422.eoct093>

Navalpoto Molina, M. (2014). *Estudio y analisis comparativo de las actuales tecnicas biometricas.* Universidad Politecnica de Marid.

Naylor, S. (2003). Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3, 525–529. <http://doi.org/10.1586/14737159.3.5.525>

Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K. V, McDonald, M. T., ... Goldstein, D. B. (2012). Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *Journal of Medical Genetics*, 49(6), 353–61. <http://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100819>

Neel, J. V, & Schull, W. J. (1991). *THE CHILDREN OF ATOMIC BOMB SURVIVORS: A genetic study.* Washington.

Neveling, K., Feenstra, I., Gilissen, C., Hoefsloot, L. H., Kamsteeg, E. J., Mensenkamp, A. R., ... Nelen, M. R. (2013). A Post-Hoc Comparison of the Utility of Sanger Sequencing and Exome Sequencing for the Diagnosis of Heterogeneous Diseases. *Human Mutation*, 34(12), 1721–1726. <http://doi.org/10.1002/humu.22450>

Ng, B. L., & Carter, N. P. (2006). Factors affecting flow karyotype resolution. *Cytometry. Part A* :

The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 69(9), 1028–36.

<http://doi.org/10.1002/cyto.a.20330>

Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., ... Bamshad, M. J.

(2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature Genetics*, 42(1), 30–35. <http://doi.org/10.1038/ng.499>

Nicolaidis, K. H., Syngelaki, A., Gil, M. D. M., Quezada, M. S., & Zinevich, Y. (2014). Prenatal

detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35(3), 212–217. <http://doi.org/10.1159/000355655>

Nikiforov, Y. E., Carty, S. E., Chiosea, S. I., Coyne, C., Duvvuri, U., Ferris, R. L., ... Nikiforova, M. N.

(2015). Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid : Official Journal of the American Thyroid Association*, X(X), 1–7. <http://doi.org/10.1089/thy.2015.0305>

Nivya, K., Sri Sai Kiran, V., Ragoo, N., Jayaprakash, B., & Sonal Sekhar, M. (2015). Systemic review

on drug related hospital admissions - A pubmed based search. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.05.006>

Norton, S. J., Gorga, M. P., Widen, J. E., Folsom, R. C., Sininger, Y., Cone-Wesson, B., ... Fletcher, K.

(2000). Identification of neonatal hearing impairment: evaluation of transient evoked otoacoustic emission, distortion product otoacoustic emission, and auditory brain stem response test performance. *Ear and Hearing*, 21(5), 508–528.

<http://doi.org/10.1097/00003446-200010000-00013>

Novoa, I. et al. (2012). *Código de buenas prácticas aplicables a biobancos de investigación*

biomedica en España. España.

Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human

Leukocytes Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human

Leukocytes *, 462–466.

Nunes, E., Heslop, H., Fernandez-vina, M., Taves, C., Wagenknecht, D. R., Eisenbrey, B., ... Noreen,

H. (2011). Definitions of histocompatibility typing terms Definitions of histocompatibility

typing terms. *Blood*, 118(23), 1–5. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-05-353490>

Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y.-Y., ... Topper, S. (2017).

Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria.

GENETICS in MEDICINE, 0(February), 1–13. <http://doi.org/10.1038/gim.2017.37>

OECD. (2014). OECD Test No. 473 - In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test.

Organisation for Economic Co-Operation and Development Publishing, 473(September), 1–

20. <http://doi.org/10.1787/9789264224223-en>

Oldenburg, J., Schwaab, R., Grimm, T., Zerres, K., Hakenberg, P., Brackmann, H. H., & Olek, K.

(1993). Direct and Indirect Estimation of the Sex Ratio of Mutation Frequencies in Hemophilia

A. Am. J. Hum. Genet., (53), 1229–1238.

Ooki, A., Yamashita, K., Kikuchi, S., Sakuramoto, S., Katada, N., Kokubo, K., ... Watanabe, M. (2010).

Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor

aggressiveness in gastric cancer. *Oncogene*, 29(22), 3263–3275.

<http://doi.org/10.1038/onc.2010.76>

Organización Mundial de la Salud. (2006). Constitución de la Organización Mundial de la Salud. In

modificaciones adoptadas por la 51a asamblea mundial de la salud (Vol. Suplemento, pp. 1–

20). Retrieved from http://www.who.int/governance/eb/who_constitution_sp.pdf

Organization, W. H., & Programme, H. G. (2003). Review of Ethical Issues in Medical Genetics.

Retrieved from

http://www.who.int/genomics/publications/en/ethical_issuesin_medgenetics_report.pdf

Ormond, K. E., Wheeler, M. T., Hudgins, L., Klein, T. E., Butte, A. J., Altman, R. B., ... Greely, H. T.

(2010). Challenges in the clinical application of whole-genome sequencing. *The Lancet*,

375(9727), 1749–1751. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60599-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60599-5)

Ortega Torres, J. Documento Guia Pruebas de ADN para investigacion de Maternidad y/o

Maternidad (2015). Colombia: Instituto Colombiano de Bienestar Familiar.

Otlowski, M. (2010). *Biobanks Information Paper*. Australia.

Ou, C. N., & Rognerud, C. L. (2001). Diagnosis of hemoglobinopathies: Electrophoresis vs. HPLC. In

Clinica Chimica Acta (Vol. 313, pp. 187–194). [http://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00672-6](http://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00672-6)

Pampols, T., Rueda, J., Mil??, M., Valverde, D., Gar??n, N., Vallcorba, I., & Rosell, J. (2013). El

documento de consentimiento informado para la realizaci??n de pruebas gen??ticas en

el ??mbito asistencial y en proyectos de investigaci??n. *Diagnostico Prenatal*, 24(2), 46–56.

<http://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.05.001>

Pardo, G. G. (2004). ADN: Historia de un exito cientifico. *Revista Colombiana de Filosofia de La*

Ciencia, 3(10–11), 9–40.

Pardue, M. Lou, & Gall, J. G. (1969). MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO THE.

Proc Natl Acad Sci U S A, 64(1), 600–604.

Pardue, M. Lou, & Gall, J. G. (1970). Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. *Science*,

168(3937), 1356 LP-1358. Retrieved from

<http://science.sciencemag.org/content/168/3937/1356.abstract>

Paredes, M., Galindo, A., Bernal, M., Avila, S., Elena, R., Andrade, D., ... Salas, A. (2003). Analysis of the CODIS autosomal STR loci in four main Colombian regions. *Forensic Science International*, *137*, 67–73. [http://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00271-8](http://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00271-8)

Pass, K. A., & Neto, E. C. (2009). Update: Newborn Screening for Endocrinopathies. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *38*(4), 827–837. <http://doi.org/10.1016/j.ecl.2009.08.005>

Patau, K., Smith, D. W., Therman, E., Inhorn, S. L., & Wagner, H. P. (1960). Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet (London, England)*, *1*(7128), 790–793.

Patiño, L. C., Battu, R., Ortega-Recalde, O., Nallathambi, J., Anandula, V. R., Renukaradhya, U., & Laissue, P. (2014). Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS ONE*, *9*(10), 3–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109576>

Pearce, J. M. S. (2009). The ophthalmoscope: Helmholtz's Augenspiegel. *European Neurology*. <http://doi.org/10.1159/000198418>

Pearce, M., Demartino, L., McMahon, R., Hamel, R., Maloney, B., Stansfield, D. M., ... Tavakoli, N. P. (2016). Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, *7*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.02.005>

Peña, J. A., Alfonso-sánchez, M. A., García-obregón, S., & Pérez-miranda, A. (2002). Aislamiento por distancia en poblaciones europeas sobre la base de polimorfismos genéticos séricos. *Revista de Antropología Física*, *2*, 31–39.

- Pertl, B., Sekizawa, A., Samura, O., Orescovic, I., Rahaim, P. T., & Bianchi, D. W. (2000). Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum.Genet.*, *106*(1), 45–49.
- Peterlin, B., & Maver, A. (2012). INTEGRATIVE “OMIC” APPROACH TOWARDS UNDERSTANDING THE NATURE OF HUMAN DISEASES. *BJMG*, *15*, 45–50.
- Petersen, M. B. (2002). Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clinical Genetics*, *62*(1), 1–13. <http://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.620101.x>
- Petersen, M. B., & Willems, P. J. (2006). Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clinical Genetics*. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00613.x>
- Pevsner, J. (2009). *Bioinformatics and Functional Genomics, 2nd Ed. Tools and Applications*. <http://doi.org/10.1002/9780470451496>
- Phadke, S., & Gowda, M. (2013). Genetic testing in children. *Indian Pediatrics*, *50*(9), 823–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24838933>
- Pinto, B., & Gulfo, R. (2013). Asentimiento y consentimiento informado en pediatría : aspectos bioéticos y jurídicos en el contexto colombiano. *Revista Colombiana de Bioética*, *8*(1), 144–165.
- Pinto, N., Gusmão, L., & Amorim, A. (2011). X-chromosome markers in kinship testing: A generalisation of the IBD approach identifying situations where their contribution is crucial. *Forensic Science International: Genetics*, *5*(1), 27–32. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.01.011>
- Piro, O. E. (2012). *Breve historia del DNA, su estructura y función. Departamento de física e Instituto IFLP (CONICET) (Vol. 67)*.

- Plagnol, V. (2014). RAPIDR: an analysis package for non-invasive prenatal testing of aneuploidy. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(20), 2965–2967.
<http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu419>
- Pohl, G., & Shih, L. (2004). Principle and applications of digital PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *4*(1), 41–47. <http://doi.org/10.1586/14737159.4.1.41>
- Ponnuraj, K. T. (2011). Cytogenetic Techniques in Diagnosing Genetic Disorders. In K. Ikehara (Ed.), *Advances in the Study of Genetic Disorders* (1st ed., Vol. 46, pp. 45–64). InTechOpen.
- Poon, L. L. M., Leung, T. N., Lau, T. K., & Lo, Y. M. D. (2000). Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, *46*(11), 1832–1834.
<http://doi.org/10.1373/clinchem.2004.041806>
- Post, S. (1995). *Encyclopedia of Bioethics Volume 1 (A-C)*. *Bioethics*. Retrieved from
<http://indianmedicine.eldoc.ub.rug.nl/root/R/96951/>
- Praither, J. D. (1985). Basic principles of radioimmunoassay testing: a simple approach. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, *13*(1), 34–43. Retrieved from
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=9174268>
- Price, D. (2005). The Human Tissue Act 2004. *Modern Law Review*, *68*(5), 798–821. Retrieved from
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1468-2230.2005.00561.x> ER -
- Pupa, S. M., Tagliabue, E., Ménard, S., & Anichini, A. (2005). HER-2: A biomarker at the crossroads of breast cancer immunotherapy and molecular medicine. *Journal of Cellular Physiology*, *205*(1), 10–18. <http://doi.org/10.1002/jcp.20387>
- Qi, Y., Cui, L., Ge, Y., Shi, Z., Zhao, K., Guo, X., ... Lu, Z. (2012). Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection. *BMC Infectious*

Diseases, 12(1), 384. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-384>

Raap, A. K., Florijn, R. J., Blondin, L. A. J., Wiegant, J., Vaandrager, J.-W., Vrolijk, H., ... van Ommen,

G.-J. (1996). Fiber FISH as a DNA Mapping Tool. *Methods (San Diego, Calif.)*, 9(1), 67–73.

<http://doi.org/10.1006/meth.1996.0009>

Rao, P., Benito, E., & Fischer, A. (2013). MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. *Frontiers in*

Molecular Neuroscience, 6(39), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00039>

Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection:

Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014(ii), 1–12.

<http://doi.org/10.1155/2014/147648>

Rauch, A., Nolan, D., Martin, A., McKinnon, E., Almeida, C., & Mallal, S. (2006). Prospective genetic

screening decreases the incidence of abacavir hypersensitivity reactions in the Western

Australian HIV cohort study. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the*

Infectious Diseases Society of America, 43(1), 99–102. <http://doi.org/10.1086/504874>

Raus, I., Coroiu, R. E., & Capusan, C. S. (2016). Neuroimaging in pediatric phakomatoses. An

educational review. *Clujul Medical*, 89(1), 56. <http://doi.org/10.15386/cjmed-417>

Rawe, V., & Cuzzi, J. (2012). La CGH con arrays (aCGH) para todos los cromosomas : Un concepto

avanzado para el diagnóstico genético preimplantatorio. *Reproduccion*, 27(2), 96–100.

Regina, N., Herrera, M., Andrés, C., Carmona, C., Carlos, L., & Herrera, B. (2014). Pruebas

bioquímicas para la detección de metabolitos producidos en los errores innatos del

metabolismo. *Iatreia*, 27(4), 417–427.

Reid, M. E. (2009). MNS blood group system: A review. *Immunohematology*.

Reijs, B. L. R., Teunissen, C. E., Goncharenko, N., Betsou, F., Blennow, K., Baldeiras, I., ... Visser, P. J.

(2015). The central biobank and virtual biobank of BIOMARKAPD: A resource for studies on neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology*, 6(OCT), 1–7.

<http://doi.org/10.3389/fneur.2015.00216>

Renna, M. D., Pisani, P., Conversano, F., Perrone, E., Casciaro, E., Renzo, G. C. Di, ... Casciaro, S.

(2013). Sonographic markers for early diagnosis of fetal malformations. *World Journal of Radiology*, 5(10), 356–71. <http://doi.org/10.4329/wjr.v5.i10.356>

Republica de Colombia, C. Código Civil (2000). colombia: diario oficial numero.

Republica de Colombia, C. ley 721 de 2001 (2001). Colombia: Diario oficial numero 44.661 de 29 de diciembre de 2001.

Republica de Colombia, & Social, M. de S. y P. Ley 1392 de 2010 POR MEDIO DE LACUALSE RECONOCEN LAS ENFERMEDADES HUERFANAS EN COLOMBIA, 2010 (2010). Colombia.

Retrieved from

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/ley-1392-de-2010.pdf>

Resendes, B. L., Williamson, R. E., & Morton, C. C. (2001). At the speed of sound: gene discovery in the auditory system. *American Journal of Human Genetics*, 69(5), 923–35.

<http://doi.org/10.1086/324122>

Restrepo-Fernández, C. M. (2007). *Las pruebas de filiación. Apuntes de genética para abogados* (primera). Bogota: Universidad del Rosario.

Restrepo, C. M. (2006). *Genetica de las pruebas de filiacion: lo que un abogado debe saber* (primera). bogota: Universidad del Rosario.

Rezaie, T., Karimi-Nejad, M.-H., Meshkat, M.-R., Sohbati, S., Karimi-Nejad, R., Najmabadi, H., &

- Sarfarazi, M. (2007). Genetic screening of leber congenital amaurosis in a large consanguineous Iranian family. *Ophthalmic Genetics*, 28(4), 224–8.
<http://doi.org/10.1080/13816810701663550>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–423.
<http://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Riegel, M. (2014). Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*, 37(1 Suppl), 194–209. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572014000200006>
- Rigau, M., Rigau, M., Morote, J., Mir, M. C., Ballesteros, C., Garcia, M., ... Reventó, J. (2010). PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine PSGR and PCA3 as Biomarkers for the Detection of Prostate Cancer in Urine, (December).
<http://doi.org/10.1002/pros.21211>
- Rivera, H. (2016). Trisomía 21 : autoría reivindicada. *Espacio Del Divulgador*, 23(3), 261–264.
- Rizzo, J. M., & Buck, M. J. (2012). Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prevention Research*, 5(7), 887–900. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0432>
- Robson, M. E., Storm, C. D., & Weitzel, J. (2010). American Society of Clinical Oncology policy statement update: Genetic and genomic testing for cancer susceptibility. ... *of Clinical Oncology*. Retrieved from

<http://jco.ascopubs.org/cgi/content/full/28/5/893%5Cnfile:///Users/Ravi>

Sharaf/Documents/Papers/2010/Robson/... of Clinical Oncology 2010

Robson.pdf%5Cnpapers://5aecfcca-9729-4def-92fe-c46e5cd7cc81/Paper/p9605

Roche, M. I., & Berg, J. S. (2015). Incidental findings with genomic testing: Implications for genetic counseling practice. *Current Genetic Medicine Reports*, 3(4), 166–176.

<http://doi.org/10.1007/s40142-015-0075-9>

Roche, P. A., & Annas, G. J. (2006). DNA testing, banking, and genetic privacy. *The New England Journal of Medicine*, 355(6), 545–546. <http://doi.org/10.1056/NEJMp068136>

Rodríguez-hernandez, C. O., Torres-Garcia, S. E., Olivera-Sandoval, C., Ramirez-Castrillo, F. Y., Loera-Muro, A., Avelar-Gonzalez, F., & Guerrero-Barrera, A. L. (2014). Cell culture : History , Development and Prospects. *International Journal of Current Research*, 2(12), 188–200.

Roewer, L., & Epplen, J. T. (1992). Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Science International*, 53(2), 163–171. [http://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90193-Z](http://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90193-Z)

Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., ... Hidaka, N. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1059–65. <http://doi.org/10.1126/science.2772657>

Ronaghi, M., Uhlén, M., & Nyren, P. (1998). A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science*, 281(5375), 363 LP-365. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/281/5375/363.abstract>

Rondon, S. M., & Rangel, N. E. (2012). Cytogenetic Analysis of Primary Cultures and Cell Lines : Generalities , Applications and Protocols. In P. Tirunilai (Ed.), *Recent Trends in Cytogenetic*

Studies - Methodologies and Applications (1st ed., pp. 1–24). Rijeka: Intech.

Rong, H., Liu, T. B., Yang, K. J., Yang, H. C., Wu, D. H., Liao, C. P., ... Shen, Q. J. (2011). MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *Journal of Psychiatric Research*, *45*(1), 92–95. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.04.028>

Rooney, D. E. (2001). *Human_Cytogenetics_Malignancy_and_acquir*. (Oxford University Press, Ed.) (3rd ed.).

Ross et al, Ross, L. F. L. F., Saal, H. M., David, K. L., & Anderson, R. R. (2013). Ethical and Policy Issues in Genetic Testing and Screening of Children. *Pediatrics*, *15*(3), 234–45. <http://doi.org/10.1038/gim.2012.176>

Rowley, P. T., & Saller, D. N. (2001). Genetic Screening and Testing. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–5). Nature Publishing Group. <http://doi.org/10.1038/npg.els.0003848>

Roychowdhury, S., Iyer, M. K., Robinson, D. R., Lonigro, R. J., Wu, Y.-M., Cao, X., ... Chinnaiyan, a. M. (2011). Personalized Oncology Through Integrative High-Throughput Sequencing: A Pilot Study. *Science Translational Medicine*, *3*(111), 111ra121-111ra121. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003161>

Ruitberg, C. M., Reeder, D. J., & Butler, J. M. (2001). STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research*, *29*(1), 320–322. <http://doi.org/10.1093/nar/29.1.320>

Rumball, S., & Smith, A. M. Human Genetic Data: Preliminary Study by the IBC on its Collection, Processing, Storage and Use (2002).

Russell, M. C., & Butkus, S. N. (2014). Mental health and the Army. *JAMA Psychiatry*, *71*(8), 966–967. <http://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.695>

- Sagoo, G. S., Butterworth, A. S., Sanderson, S., Shaw-Smith, C., Higgins, J. P. T., & Burton, H. (2009). Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 11(3), 139–146.
<http://doi.org/10.1097/GIM.0b013e318194ee8f>
- Sahu, P., Pinkalwar, N., Dubey, R., Paroha, S., Chatterjee, S., & Chatterjee, T. (2011). Biomarkers: an emerging tool for diagnosis of a disease and drug development. *Asian J. Res.*, 1(1), 9–16.
- Saito, H., Sekizawa, A., Morimoto, T., Suzuki, M., & Yanaihara, T. (2000). Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet*, 356(9236), 1170.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02767-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02767-7)
- Saladores, P., Mürdter, T., Eccles, D., Chowbay, B., Zgheib, N. K., Winter, S., ... Brauch, H. (2015). Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *The Pharmacogenomics Journal*, 15(1), 84–94.
<http://doi.org/10.1038/tpj.2014.34>
- Salvat Puiig, J. (2001). *Tipaje de los marcadores geneticos ABO , Rh , MNSs , Gc , Pi y AcP en la comarca Salmantina de las Arribes del Duero: Aplicaciones Medicolegales* (1st ed.). Ediciones Universidad de Salamanca, Salamaca, España.
- Salvaterra, E., Lecchi, L., Giovanelli, S., Butti, B., Bardella, M. T., Bertazzi, P. A., ... Rebullà, P. (2008). Banking together. A unified model of informed consent for biobanking. *EMBO Reports*, 9(4), 307–313. <http://doi.org/10.1038/embor.2008.41>
- Samuels, D., Han, L., Li, J., Quangu, S., Clark, T., Shyr, Y., & Guo, Y. (2014). Finding the lost treasures in exome sequencing data. *Trends Genet*, 29(10), 593–599.

<http://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.006>.Finding

Sánchez, Y. G. (2008). La protección de los datos genéticos: el derecho a la autodeterminación informativa. *DS: Derecho Y Salud*, 16(1), 59–78. Retrieved from http://www.researchgate.net/profile/Yolanda_Gomez3/publication/43125810_La_proteccion_de_los_datos_geneticos_el_derecho_a_la_autodeterminacin_informativa/links/543fd2840cf2be1758cfdcc8.pdf

Sanders, D. B., & Fink, A. K. (2016). Background and Epidemiology. *Pediatric Clinics of North America*, 63(4), 567–584. <http://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.04.001>

Sanger, F., & Nicklen, S. (1977). DNA sequencing with chain-terminating. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74(12), 5463–5467. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.74.12.5463>

Sarafoglou, K., Banks, K., Gaviglio, a., Hietala, a., McCann, M., & Thomas, W. (2012). Comparison of One-Tier and Two-Tier Newborn Screening Metrics for Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatrics*, 130(5), e1261–e1268. <http://doi.org/10.1542/peds.2012-1219>

Sasaki, S., & Shimokawa, H. (1995). The amelogenin gene. *International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 127–133.

Sass, H.-M. (2007). Fritz Jahr's 1927 concept of bioethics. *Kennedy Institute of Ethics Journal*, 17(4), 279–295. <http://doi.org/10.1353/ken.2008.0006>

Sawyer, S. L., Schwartzenruber, J., Beaulieu, C. L., Dymont, D., Smith, A., Chardon, J. W., ...

Boycott, K. M. (2014). Exome Sequencing as a Diagnostic Tool for Pediatric-Onset Ataxia. *Human Mutation*, 35(1), 45–49. <http://doi.org/10.1002/humu.22451>

Schilling, E., & Rehli, M. (2007). Global, comparative analysis of tissue-specific promoter CpG methylation. *Genomics*, 90(3), 314–323. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.04.011>

Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A., ... Ried, T.

(1996). Multicolor spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science*, 273, 494–497.

Scott, C. T., Caulfield, T., Borgelt, E., & Illes, J. (2012). Personal medicine—the new banking crisis.

Nature Biotechnology, 30(5), 466–466. <http://doi.org/10.1038/nbt0512-466a>

Scott, R. T., Upham, K. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Scott, K. L., Taylor, D., ... Treff, N. R. (2013).

Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 100(3), 697–703.

<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.035>

Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2, 971–972.

[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)90287-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)90287-X)

Sedrak, M., Hashad, D., Adel, H., Azzam, A., & Elbeltagy, N. (2011). Use of Free Fetal DNA in

Prenatal Noninvasive Detection of Fetal RhD Status and Fetal Gender by Molecular Analysis of Maternal Plasma. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 15(9), 627–631.

<http://doi.org/10.1089/gtmb.2010.0263>

Sena-Yoshinaga, T. A., Almeida, M. G., Côrtes-Andrade, I. F., & Lewis, D. R. (2014). Triagem auditiva

neonatal com potencial evocado auditivo de tronco encefálico automático: a utilização de diferentes tecnologias. *Audiology - Communication Research*, 19(1), 19–24.

<http://doi.org/10.1590/S2317-64312014000100005>

Shanmuganathan, R., Basheer, N. B., Amirthalingam, L., Muthukumar, H., Kaliaperumal, R., &

Shanmugam, K. (2013). Conventional and nanotechniques for DNA methylation profiling.

Journal of Molecular Diagnostics. <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.06.007>

- Sheffield, V. C., Beck, J. S., Kwitek, A. E., Sandstrom, D. W., & Stone, E. M. (1993). The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, *16*(2), 325–332. <http://doi.org/10.1006/geno.1993.1193>
- Shi, T., Gao, G., & Cao, Y. (2016). Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Disease Markers*, *2016*, 1–10.
- Shi, Z., Johnson, J. J., & Stack, M. S. (2012). Fluorescence in situ hybridization for microRNA detection in archived oral cancer tissues. *Journal of Oncology*, *2012*, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2012/903581>
- Shickle, D. (2006). The consent problem within DNA biobanks. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.*, *37*, 503–519. <http://doi.org/10.1016/j.shpsc.2006.06.007>
- Shiefa, S., Amargandhi, M., Bhupendra, J., Moulali, S., & Kristine, T. (2013). First trimester maternal serum screening using biochemical markers PAPP-A and Free β -hCG for down syndrome, patau syndrome and edward syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *28*(1), 3–12. <http://doi.org/10.1007/s12291-012-0269-9>
- Shoda, K., Ichikawa, D., Fujita, Y., Masuda, K., Hiramoto, H., Hamada, J., ... Otsuji, E. (2016). Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 1–10. <http://doi.org/10.1007/s10120-016-0599-z>
- Siddiquee, S., Rovina, K., & Azriah, A. (2015). A Review of Peptide Nucleic Acid. *Adv. Tech. Biol. Med*, *3*(2), 1000131. <http://doi.org/10.4172/2379-1764>.
- Sidransky, D. (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(3), 210–9. <http://doi.org/10.1038/nrc755>
- Sim, sarah C., Altman, R. B., & Ingelman-Sundberg, M. (2011). Databases in the Area of

Pharmacogenetics. *Hum Mutat*, 32(5), 526–531.

<http://doi.org/10.1002/humu.21454>.Databases

Simons, A., Shaffer, L. G., & Hastings, R. J. (2013). International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). In *Cytogenetic and Genome Research* (Vol. 141, pp. 39–51).

<http://doi.org/10.1159/000353118>

Simunek, M., Hossfeld, U., & Wissemann, V. (2011). “Rediscovery” revised - the cooperation of Erich and Armin von Tschermak-Seysenegg in the context of the “rediscovery” of Mendel’s laws in 1899-1901. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 13(6), 835–841.

<http://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00491.x>

Siza Fuentes, L., Sanchez, D. Gomez, Y. Restrepo, C. M. Gutierrez, A. Fonseca, D. (2010). Análisis de marcadores STR sobre el cromosoma X en una población de Bogotá. *Uni. Med.*, 51(3), 284–289.

Speicher, M. R. (2010). Chromosomes. In *Vogel and Motulsky’s Human Genetics: Problems and Approaches (Fourth Edition)* (pp. 55–130). <http://doi.org/10.1007/978-3-540-37654-5>

Speiser, P. W., Azziz, R., Baskin, L. S., Ghizzoni, L., Hensle, T. W., Merke, D. P., ... White, P. C. (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(9), 4133–60. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-2631>

Spencer, K., Cowans, N. J., Molina, F., Kagan, K. O., & Nicolaides, K. H. (2008). First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 31(2), 147–152.

<http://doi.org/10.1002/uog.5163>

- Sperber, G. H., & Sperber, S. M. (2008). Thompson and Thompson Genetics in Medicine. 7th edition. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. <http://doi.org/10.1597/07-168.1>
- Srivastava, S., Cohen, J. S., Vernon, H., Baraano, K., McClellan, R., Jamal, L., ... Fatemi, A. (2014). Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Annals of Neurology*, *76*(4), 473–483. <http://doi.org/10.1002/ana.24251>
- SS, O., HH, K., SS, E., & al, et. (1961). Serum creatine phosphokinase: Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. *Archives of Neurology*, *4*(5), 520–525. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1961.00450110050006>
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, *2*, 29–47.
- Stjernschantz, J., & Mats, F. (2013). International guidelines on biobank research leave researchers in ambiguity : why is this so ?, 449–451. <http://doi.org/10.1007/s10654-013-9815-x>
- Strech, D. (2015). European Journal of Medical Genetics Ethical review of biobank research : Should RECs review each release of material from biobanks operating under an already-approved broad consent and data protection model ? *European Journal of Medical Genetics*, *58*(10), 545–549. <http://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.09.008>
- Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., & Gatta, V. (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(3), 3245–3276. <http://doi.org/10.3390/ijms13033245>
- Sudlow, C., Gallacher, J., Allen, N., Beral, V., Burton, P., Danesh, J., ... Collins, R. (2015). UK Biobank: An Open Access Resource for Identifying the Causes of a Wide Range of Complex Diseases of

Middle and Old Age. *PLoS Medicine*, 12(3), 1–10.

<http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001779>

Sudoyo, A. W., & Hardi, F. (2011). Cytogenetics in solid tumors: lessons from the Philadelphia Chromosome. *Acta Medica Indonesiana*, 43(1), 68–73.

Sun, J., Zhu, K., Zheng, W., & Xu, H. (2015). A comparative study of disease genes and drug targets in the human protein interactome. *BMC Bioinformatics*, 16(5), 1–9.

<http://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S5-S1>

Svidnicki, M. C. C. M., Silva-Costa, S. M., Ramos, P. Z., dos Santos, N. Z. P., Martins, F. T. A., Castilho, A. M., & Sartorato, E. L. (2015). Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX(R) technology. *BMC Medical Genetics*, 16(85), 1–11. <http://doi.org/10.1186/s12881-015-0232-8>

Szibor, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Science International: Genetics*. <http://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.03.003>

Tait, B. D., Süsal, C., Gebel, H. M., Nickerson, P. W., Zachary, A. a, Claas, F. H. J., ... Opelz, G. (2013). Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*, 95(1), 19–47.

<http://doi.org/10.1097/TP.0b013e31827a19cc>

Tajima, T., & Fukushi, M. (2016). Neonatal mass screening for 21-hydroxylase deficiency. *Clinical Pediatric Endocrinology : Case Reports and Clinical Investigations : Official Journal of the Japanese Society for Pediatric Endocrinology*, 25(1), 1–8. <http://doi.org/10.1297/cpe.25.1>

Talkowski, M. E., Ordulu, Z., Pillalamarri, V., Benson, C. B., Blumenthal, I., Connolly, S., ... Morton, C. C. (2012). Clinical diagnosis by whole-genome sequencing of a prenatal sample. *The New*

England Journal of Medicine, 367(23), 2226–32. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1208594>

Tao, V. Q., Chan, K. Y. K., Chu, Y. W. Y., Mok, G. T. K., Tan, T. Y., Yang, W., ... Chung, B. H. Y. (2014).

The clinical impact of chromosomal microarray on paediatric care in Hong Kong. *PLoS ONE*, 9(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109629>

Taruscio, D. (2000). Italian guidelines for genetic testing. *Minerva Biotecnologica*.

Taucher, S. C., María, A., Soto, F., Millanao, A. P., De, E., & Rebaza, R. (2014). Estudio cromosómico en abortos espontáneos. *Rec Chil Obstet Ginecol*, 79(1), 40–46.

Tharapel, A. (1999). Human Chromosome Nomenclature. In S. L. Gersen & M. B. Keagle (Eds.), *The Principles of Clinical Cytogenetics* (pp. 31–66). Totowa, NJ: Humana Press.

http://doi.org/10.1007/978-1-59259-643-0_3

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <http://doi.org/10.1038/35048692>

Therman, E., & Susman, M. (1994). Human Chromosomes: Structure, Behavior and Effects. *Am. J. Hum. Genet.*, 54, 568.

Thomson, G. (1991). HLA population genetics. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 5(2), 247–260.

Thorsby, E. (2009). A short history of HLA. *Tissue Antigens*. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x>

Tjio, J. H. (1978). The chromosome number of man. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 130(6), 723–724.

Tozzo, P., Caenazzo, L., & Rodriguez, D. (2012). Genetic Testing for Minors: Comparison between

Italian and British Guidelines. *Genetics Research International*, 2012, 786930.

<http://doi.org/10.1155/2012/786930>

Treff, N. R., Fedick, A., Tao, X., Devkota, B., Taylor, D., & Scott, R. T. (2013). Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1377–1384.e6. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.018>

Trepanier, A., Ahrens, M., McKinnon, W., Peters, J., Stopfer, J., Grumet, S. C., ... Vockley, C. W. (2004). Genetic cancer risk assessment and counseling: Recommendations of the national society of genetic counselors. *Journal of Genetic Counseling*.

<http://doi.org/10.1023/B:JOGC.0000018821.48330.77>

Trompoukis, C., Kalaitzis, C., Giannakopoulos, S., Sofikitis, N., & Touloupidis, S. (2007). Semen and the diagnosis of infertility in Aristotle. *Andrologia*, 39(1), 33–37.

<http://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2006.00757.x>

Tsai, Y. (2000). Cost-effective screening methods for various single gene defects in single cells using high magnesium and total ionic strength and restriction enzymes. *Prenatal Diagnosis*, 20(August), 979–985.

Tsuchiya, K. D. (2011). Fluorescence in situ hybridization. *Clinics in Laboratory Medicine*.

<http://doi.org/10.1016/j.cll.2011.08.011>

Tsui, D. W., Chiu, R. W., & Lo, Y. D. (2010). Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma. *Chimerism (Print)*, 1(1), 30–35. <http://doi.org/10.4161/chim.1.1.12439>

Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. (2009). Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *American Journal of Human Genetics*.

<http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022>

- Turner, E. H., Lee, C., Ng, S. B., Nickerson, D. a, & Shendure, J. (2009). Massively parallel exon capture and library-free resequencing across 16 genomes. *Nature Methods*, 6(5), 315–316.
<http://doi.org/10.1038/nmeth.f.248>
- UNESCO. (2003). *International Declaration on Human Genetic Data. Human Rights.*
- Vaiopoulos, A. G., Athanasoula, K. C., Papantoniou, N., & Kolialexi, A. (2013). Advances in non-invasive prenatal diagnosis. *In Vivo (Athens, Greece)*, 27(2), 165–70. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23422474>
- Valdes, R., & Yin, D. (Tyler). (2016). Fundamentals of Pharmacogenetics in Personalized, Precision Medicine. *Clinics in Laboratory Medicine*, 36(3), 447–459.
<http://doi.org/10.1016/j.cll.2016.05.006>
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., De Souza, P. R. E., De Albuquerque Tavares Carvalho, A., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11.
<http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
- Valsami, S., Politou, M., Boutsikou, T., Briana, D., Papatista, M., & Malamitsi-Puchner, A. (2015). Importance of Direct Antiglobulin Test (DAT) in Cord Blood: Causes of DAT (+) in a Cohort Study. *Pediatrics and Neonatology*, 56(4), 256–260.
<http://doi.org/10.1016/j.pedneo.2014.11.005>
- Van Driessche, E., De Cupere, F., Cruz, E., Machado, J., & Beeckmans, S. (2000). Lectinas de Origen Vegetal: Definiciones, Métodos de Purificación y Aplicaciones. *Acta Farm. Bonaerense*, 19(2).
- Van Dyke, D. L., Palmer, C. G., Nance, W. E., & Yu, P. L. (1977). Chromosome polymorphism and twin zygosity. *American Journal of Human Genetics*, 29(5), 431–437.

- van Huet, R. a C., Pierrache, L. H. M., Meester-Smoor, M. a, Klaver, C. C. W., van den Born, L. I., Hoyng, C. B., ... Klevering, B. J. (2015). The efficacy of microarray screening for autosomal recessive retinitis pigmentosa in routine clinical practice. *Molecular Vision*, 21(April), 461–76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4415583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vargas-alarc, G., Tovilla-z, C., & Fragoso, M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaseta Medica de Mexico*, 149, 220–228.
- Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27(9), 1423–1440. <http://doi.org/10.1007/s00299-008-0571-4>
- Vega-robledo, G. B., & Oliva-rico, D. (2014). Importancia de los microARN en el diagnóstico y desarrollo de enfermedades. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 52(55), 3–8. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2014/im143n.pdf>
- Vela-Amieva, M. et al. (2011). Historia de la fenilcetonuria. *Acta Pediatr Mex*, 32(5), 281–286.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–51. <http://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Vevaina, J. R., Nora, L. M., & Bone, R. C. (1993). Issues in biomedical ethics. *Disease-a-Month : DM*, 39(12), 869–925. [http://doi.org/10.1016/0011-5029\(93\)90019-Y](http://doi.org/10.1016/0011-5029(93)90019-Y)
- Voelkerding, K. V, Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-Generation Sequencing : From Basic

Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 641–658.

<http://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>

Voellenkle, C., van Rooij, J., Cappuzzello, C., Greco, S., Arcelli, D., Di Vito, L., ... Martelli, F. (2010).

MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients.

Physiological Genomics, 42(3), 420–426.

<http://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00211.2009>

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9236–9241.

<http://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>

Volpi, E. V., & Bridger, J. M. (2008). FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ

hybridization technique. *BioTechniques*. <http://doi.org/10.2144/000112811>

Wacker, J. G. (1998). A definition of theory research guidelines for different-theory building

research methods in operations management. *Journal of Operations Management*, 16(4),

361–385. [http://doi.org/10.1016/S0272-6963\(98\)00019-9](http://doi.org/10.1016/S0272-6963(98)00019-9)

Waddington, C. H. (2012). The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41(December

2011), 10–13. <http://doi.org/10.1093/ije/dyr184>

Wain, K. E., & Thorland, E. C. (2011). *Clinical Utility of Chromosomal Microarray Testing*.

Wald, N., Stone, R., Cuckle, H. S., Grudzinskas, J. G., Barkai, G., & Brambati, B. (1992). First

trimester concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14

in Down TMs syndrome. *BMJ: British Medical Journal*, 305(July), 1992.

Walker, R. H., Meyers, M. A., & Phillips, L. M. (1987). The probability of exclusion of the HLA-A,B

system in North American whites and blacks in parentage tests. *Transfusion*, 27(1), 75–79.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3468671>

- Walknowska, J., Conte, F., & Grumbach, M. (1969). PRACTICAL AND THEORETICAL IMPLICATIONS OF FETAL/MATERNAL LYMPHOCYTE TRANSFER. *The Lancet*, 293(7606), 1119–1122.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)91642-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)91642-0)
- Walley, N. M., Nicoletti, P., & Goldstein, D. B. (2010). Pharmacogenetics. In M. R. Speicher, S. E. Antonarakis, & A. G. Motulsky (Eds.), *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches (Fourth Edition)* (4th ed., pp. 1–981). New York: Springer.
<http://doi.org/10.1007/978-3-540-37654-5>
- Walsh, P., Kane, N., & Butler, S. (2005). The clinical role of evoked potentials. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 76 Suppl 2(August 2006), ii16-22.
<http://doi.org/10.1136/jnnp.2005.068130>
- Wambua, S., Mwangi, T. W., Kortok, M., Uyoga, S. M., Macharia, A. W., Mwacharo, J. K., ... Williams, T. N. (2006). The effect of α -thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Medicine*, 3(5), 643–651.
<http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030158>
- Wan, T. S. K., & Ma, E. S. K. (2011). Molecular Cytogenetics : An Indispensable Tool for Cancer Diagnosis, 96–110.
- Wang, Q., Li, P., Li, A., Jiang, W., Wang, H., Wang, J., & Xie, K. (2012). Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 31(1), 97. <http://doi.org/10.1186/1756-9966-31-97>
- Wang, W., Sun, Y., Huang, W., He, B., Zhao, Y., & Chen, Y. (2016). Genome-wide Long Non-coding RNA Analysis Identified Circulating LncRNAs as Novel Non-invasive Diagnostic Biomarkers for Gynecological Disease, (August 2015), 1–12. <http://doi.org/10.1038/srep23343>

Warr, A., Robert, C., Hume, D., Archibald, A., Deeb, N., & Watson, M. (2015). Exome Sequencing : Current and Future Perspectives, 5(August), 1543–1550.

<http://doi.org/10.1534/g3.115.018564>

Watson, M. S., Cutting, G. R., Desnick, R. J., Driscoll, D. A., Klinger, K., & Mennuti, M. (2004). cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 1–5.

Weatherall, D. J. (2002). Historical Review towards molecular medicine: reminiscences of the haemoglobin field, 1960-2000. *British Journal of Haematology*, 115, 729–738.

<http://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1946.tb17845.x>

Weiner, W., Child, R. M., Garvie, J. M., & PEEK, W. H. (1958). Foetal cells in the maternal circulation during pregnancy. *British Medical Journal*, 2(5099), 770–1. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2026257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Weinstein, D., Leininger, J., Hamby, C., & Safai, B. (2014). Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 7(6), 13–24.

<http://doi.org/10.1007/978-1-60761-433-3>

Welborn, J. L., & Welborn, R. (1993). Banding resolution of human chromosomes: a method of accuracy and simplicity. *American Journal of Medical Genetics*, 47(8), 1180–1183.

<http://doi.org/10.1002/ajmg.1320470810>

Welch, J. S., Westervelt, P., Ding, L., Larson, D. E., Klco, J. M., Kulkarni, S., ... Wilson, R. K. (2011). Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA*, 305(15),

1577–84. <http://doi.org/10.1001/jama.2011.497>

Welfare, M. of. Act on a Health Sector Database (2012). Iceland, Iceland. Retrieved from http://eng.velferdarraduneyti.is/media/acrobat-enskar_sidur/Act-on-a-Health-Sector-Database-as-amended.pdf

Westerlund, J. F., & Fairbanks, D. J. (2010). Gregor Mendel ' s classic paper and the nature of science in genetics courses. *Hereditas*, (147), 293–303. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2010.02199.x>

Willems, T. F., Gymrek, M., Highnam, G., Mittelman, D., & Erlich, Y. (2014). The landscape of human STR variation. *Genome Research*, gr.177774.114-. <http://doi.org/10.1101/gr.177774.114>

Willig, L. K., Petrikin, J. E., Smith, L. D., Saunders, C. J., Thiffault, I., Miller, N. A., ... Kingsmore, S. F. (2015). Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: A retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(5), 377–387. [http://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00139-3](http://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00139-3)

Wilson, J., & Jungner, Y. (1968a). Principles and practice of screening for disease. *World Health Organization*, 65(4), 281–393. <http://doi.org/10.1001/archinte.1969.00300130131020>

Wilson, J., & Jungner, Y. (1968b). Principles and practice of screening for disease. *World Health Organization*. <http://doi.org/10.1001/archinte.1969.00300130131020>

Witney, A. A., Gould, K. A., Arnold, A., Coleman, D., Delgado, R., Dhillon, J., ... Hinds, J. (2015). Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1473–1483. <http://doi.org/10.1128/JCM.02993-14>

- Wolff, D. J., Bagg, A., Cooley, L. D., Dewald, G. W., Hirsch, B. A., Jacky, P. B., ... Rao, P. N. (2007). Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 9, 134–143. <http://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060128>
- Wolpin, B. M., Chan, A. T., Hartge, P., Chanock, S. J., Kraft, P., Hunter, D. J., ... Fuchs, C. S. (2009). ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(6), 424–431. <http://doi.org/10.1093/jnci/djp020>
- Wood, D. E. (2015). National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines for Lung Cancer Screening. *Thoracic Surgery Clinics*. <http://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2014.12.003>
- Wortmann, S. B., Koolen, D. A., Smeitink, J. A., van Den Heuvel, L., & Rodenburg, R. J. (2015). Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 437–443. <http://doi.org/10.1007/s10545-015-9823-y>
- Wright, C. F., & Burton, H. (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reproduction Update*, 15(1), 139–151. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmn047>
- Wright, C. F., Wei, Y., Higgins, J. P. T., & Sagoo, G. S. (2012). Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Research Notes*, 5, 476. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-5-476>
- Xie, J., Qureshi, A. A., Li, Y., & Han, J. (2010). ABO blood group and incidence of skin cancer. *PLoS ONE*, 5(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011972>
- Yagel, S. (2013). Non-Invasive Prenatal Testing: More Questions than Answers. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 42, 369–372. <http://doi.org/10.1002/uog.12436>

- Yamada, N. A., Rector, L. S., Tsang, P., Carr, E., Scheffer, A., Sederberg, M. C., ... Brothman, A. R. (2011). Visualization of fine-scale genomic structure by oligonucleotide-based high-resolution FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, *132*, 248–254. <http://doi.org/10.1159/000322717>
- Yamamoto, F. (2004). Review: ABO blood group system - ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology*.
- Yan, J. Bin, Zhang, R., Xiong, C., Hu, C., Lv, Y., Wang, C. R., ... Zeng, F. (2014). Pyrosequencing is an accurate and reliable method for the analysis of heteroplasmy of the A3243G mutation in patients with mitochondrial diabetes. *Journal of Molecular Diagnostics*, *16*(4), 431–439. <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.03.005>
- Yarmishyn, A. A., & Kurochkin, I. V. (2015). Long non-coding RNAs: A potential novel class of cancer biomarkers. *Frontiers in Genetics*, *6*(MAR), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fgene.2015.00145>
- Yates, J. R., Malcolm, S., & Read, a P. (1989). Guidelines for DNA banking. Report of the Clinical Genetics Society working party on DNA banking. *Journal of Medical Genetics*, *26*(4), 245–250. <http://doi.org/10.1136/jmg.26.4.245>
- Yohe, S., Hauge, A., Bunjer, K., Kemmer, T., Bower, M., Schomaker, M., ... Thyagarajan, B. (2015). Clinical validation of targeted next-generation sequencing for inherited disorders. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, *139*(2), 204–210. <http://doi.org/10.5858/arpa.2013-0625-OA>
- Yousefi, J., Ajalloueyan, M., Amirsalari, S., & Fard, M. H. (2013). The specificity and sensitivity of transient otoacoustic emission in neonatal hearing screening compared with diagnostic test of auditory brain stem response in Tehran hospitals. *Iranian Journal of Pediatrics*, *23*(2), 199–204.

- Yu, H., Xu, Q., Liu, F., Ye, X., Wang, J., & Meng, X. (2015). Identification and Validation of Long Noncoding RNA Biomarkers in Human Non-Small-cell Lung Carcinomas. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(4), 645–654. <http://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000470>
- Yunis, J. J. (1976). High resolution of human chromosomes. *Science*, *191*(4233), 1268 LP-1270. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/191/4233/1268.abstract>
- Zhang, G., Zhang, Y., Ling, Y., & Jia, J. (2015). Web resources for pharmacogenomics. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, *13*(1), 51–54. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.002>
- Zhang, H., Gao, Y., Jiang, F., Fu, M., Yuan, Y., Guo, Y., ... Wang, W. (2015). Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *45*(5), 530–538. <http://doi.org/10.1002/uog.14792>
- Zhang, K., Lin, G., & Li, J. (2016). Quantitative nucleic acid amplification by digital PCR for clinical viral diagnostics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <http://doi.org/10.1515/cclm-2015-1101>
- Zhang, Y. J., Wu, H. C., Shen, J., Ahsan, H., Wei, Y. T., Yang, H. I., ... Santella, R. M. (2007). Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clinical Cancer Research*, *13*(8), 2378–2384. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1900>
- Zhou, Q., Pan, L., Chen, S., Chen, F., Hwang, R., Yang, X., ... Xu, C. (2014). Clinical application of noninvasive prenatal testing for the detection of trisomies 21, 18, and 13: A hospital experience. *Prenatal Diagnosis*, *34*(11), 1061–1065. <http://doi.org/10.1002/pd.4428>
- Ziegler, A., Koch, A., & Krockenberger, K. (2012). Personalized medicine using DNA biomarkers : a review. *Hum.Genet.*, (131), 1627–1638. <http://doi.org/10.1007/s00439-012-1188-9>
- Zimmermann, B., Hill, M., Gemelos, G., Demko, Z., Banjevic, M., Baner, J., ... Rabinowitz, M. (2012).

Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenatal Diagnosis*, 32(13), 1233–1241.

<http://doi.org/10.1002/pd.3993>

Zinn, A. R., Page, D. C., & Fisher, E. M. (1993). Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome. *Trends in Genetics : TIG*, 9(3), 90–93.