



ACTUALIZACIONES / Review

## RECORRIDO Y EVOLUCIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS CITOGÉNOMICAS EN LAS ENFERMEDADES POCO FRECUENTES De dónde venimos, dónde estamos y hacia dónde vamos

Lucía I. Vago\* 

Hospital de Niños Zona Norte Roberto Carra. Argentina

### Resumen

Las enfermedades poco frecuentes (EPF) son colectivamente comunes en la práctica diaria; la mayoría de ellas son de etiología genética e implican una alta carga de morbilidad tanto individual como poblacional.

El desarrollo tecnológico de la citogenómica, en el último siglo, pero especialmente en las últimas tres décadas revolucionó el abordaje, diagnóstico y manejo de esas patologías. Este artículo revisa los principales hitos al respecto, desde la teoría cromosómica de la herencia hasta el fascinante mapa del genoma humano telómero a telómero.

**Palabras clave:** enfermedades poco frecuentes, citogenética, biología molecular genómica.

### JOURNEY AND EVOLUTION OF CYTOGENOMICS TECHNOLOGIES IN RARE DISEASES

*Where we come from, where we are and where we are going*

### Abstract

*Rare diseases (RD) are collectively common in daily practice, with most of them having a genetic etiology and posing a high burden of morbidity both at the individual and population levels.*

*The technological development of cytogenomics over the past century, and especially in the last three decades, has revolutionized the approach, diagnosis, and management of these conditions. This article reviews the key milestones in this field, from the chromosomal theory of inheritance to the fascinating telomere-to-telomere map of the human genome.*

**Keywords:** rare diseases, cytogenetics, molecular biology, genomic.

\*E-mail: [luciavago@gmail.com](mailto:luciavago@gmail.com)

## Introducción

Alrededor de 300 millones de personas en el mundo, 1 de cada 4 familias, viven con una enfermedad poco frecuente (EPF). El 80% de estas enfermedades responde a causas genéticas. Son enfermedades crónicas, complejas, progresivas, discapacitantes, y la mayoría de ellas son potencialmente mortales.<sup>1</sup>

Se estima que una de cada quince personas en todo el mundo se ve afectada por una EPF.<sup>2</sup> Las EPF son comunes en la práctica clínica; sin embargo, el diagnóstico y tratamiento oportunos de estas enfermedades sigue siendo un desafío.

Aunque las EPF han afectado la salud humana a lo largo de la historia, el reconocimiento de este grupo de enfermedades, incluida la terminología, no surgió hasta este milenio.<sup>3</sup>

Entender y saber cómo estudiar el genoma humano es crucial a la hora de poder dar respuesta a este grupo mayoritario de EPF cuya etiología es genética. Cuando se observa retrospectivamente cuán reciente es la inacabada comprensión de la arquitectura genómica del ser humano por la comunidad científica, se puede dimensionar que este colectivo de pacientes ha sido involuntariamente discriminado y excluido de su reconocimiento y también del acceso a los cuidados médicos adecuados.

Tanto los equipos médicos como la comunidad científica en general por mucho tiempo careció de las herramientas para entender la etiología, las comorbilidades y guías de cuidados. Lógicamente, el desconocer dónde se origina el problema inhabilitó e inhabilita el desarrollo de terapias dirigidas.

Este artículo es una invitación a comprender la magnífica expedición que realizaron los investigadores en los albores del siglo XX y XXI y principalmente la revolución de la genómica en los últimos 20 años con sus implicaciones en la salud humana.

## De dónde venimos: el surgimiento de la citogenética

Los primeros diagnósticos de las

enfermedades raras comenzaron a principios del siglo XX y se basaron en parámetros bioquímicos.<sup>4</sup>

Si bien en 1882 Walther Flemming descubre material contenido en el núcleo capaz de teñirse fuertemente e ilustra los cromosomas humanos usando tintes de anilina, es recién en 1915 cuando Walter Sutton y Theodor Boveri publican de forma independiente *la Teoría cromosómica de la herencia*: los factores responsables de la herencia (genes) se encuentran en los cromosomas dentro del núcleo de cada célula y el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis puede explicar las leyes de la herencia descritas por Mendel.<sup>5,6</sup>

El término genoma fue creado en 1920 por Hans Winkler, un profesor de botánica de la Universidad de Hamburgo. Hoy sabemos que un genoma es una colección completa de ácido desoxirribonucleico (ADN) de un organismo, o sea un compuesto químico que contiene las instrucciones genéticas necesarias para desarrollar y dirigir las actividades de todo organismo.<sup>7</sup> Sabemos además que cada fibra de ADN se enrolla en metafase formando cromosomas (23 pares) y que estas instrucciones están en código: una secuencia de letras (los nucleótidos o bases nitrogenadas: adenina [A], timina [T], guanina [G] y citosina [C]).

Este conocimiento actual es el resultado de enormes investigaciones y aportes progresivos de la comunidad científica. En 1956, Joe Hin Tjio y Albert Levan establecen el número de 46 cromosomas del cariotipo humano,<sup>8</sup> y, finalmente, los métodos citogenéticos se desarrollaron en la década de 1960.

El primer descubrimiento de una aberración cromosómica humana fue realizado por Marthe Gautier y cols. de París, en mayo de 1958. Encontraron un cromosoma extra pequeño en cultivos de fibroblastos de varios niños con síndrome de Down. Esto fue anunciado en 1958 y reportado en enero de 1959.<sup>9</sup>

La mayoría de las enfermedades cromosómicas, incluido el síndrome de Down o trisomía



21 (que no es una EPF), se descubren a partir de entonces.

La introducción de las bandas cromosómicas en 1969-70 ha sido una de las innovaciones más importantes en citogenética. El descubrimiento fue realizado por primera vez por el grupo de Caspersson y Zech con quinacrina, que se intercalaba en el ADN produciendo bandas Q oscuras y claras visibles mediante microscopía de fluorescencia a lo largo de cada cromosoma.<sup>10</sup> Lore Zech descubrió al año siguiente que todos los cromosomas humanos podían identificarse entre sí mediante bandas Q.<sup>11,12</sup>

Los métodos de bandas han contribuido a la precisión del mapeo cromosómico en la patología cromosómica estructural y en la citogenética del cáncer; un ejemplo de ello es el descubrimiento de Zech y Rowley del cromosoma Filadelfia: una translocación desequilibrada 9;22.<sup>13</sup> Actualmente se sabe que muchos cánceres surgen en células madre que han sufrido reordenamientos cromosómicos masivos debido a un único evento de cromotripsis, y las bandas son esenciales para su análisis.<sup>14</sup>

Las técnicas de citogenética convencional han sido, durante más de 40 años, el método de elección de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales de más de 5 Mb-10 Mb en pacientes con leucemias, retraso del desarrollo, o mental, discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista y/o anomalías congénitas múltiples.<sup>15</sup> Desgraciadamente, estas técnicas son manuales, absolutamente dependientes de la experiencia y habilidad de personal altamente calificado, y su resolución es muy variable.

Los estudios moleculares y la citogenética molecular surgieron recién en las últimas décadas del siglo XX. Pardue y Gall fueron los primeros en utilizar en 1972 la hibridación *in situ* para mapear secuencias de ADN en cromosomas. En 1981, los genes de las globinas humanas, la insulina y las cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa se asignaron a los brazos cortos de los cromosomas 16, 11 y 2, respectivamente.<sup>16,17</sup>

Debido a que el marcaje con radioisótopos requería mucho tiempo y era poco práctico, pronto fue reemplazado por el marcaje de fluorescencia y la microscopía UV. La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se convirtió en ese momento en el método estándar tanto para mostrar microdeleciones como para el mapeo de genes y, en este sentido, reemplazó a los clásicos métodos de ligamiento genético.<sup>18</sup> Gran número de síndromes de microdelección, como el síndrome de DiGeorge (22q-) o el síndrome de Williams (7q-), se describieron y diagnosticaron durante mucho tiempo con la tecnología de FISH.

### La explosión de la biología molecular

Desde el desarrollo de la secuenciación de Sanger en 1980 y la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Kary Mullis en 1986 (ambos premios Nobel de Bioquímica por estos desarrollos tecnológicos), el diagnóstico de la causa molecular de patologías genéticas siguió una curva ascendente en forma ininterrumpida.

La secuenciación de Sanger, desarrollada por el bioquímico inglés Frederick Sanger y su equipo, es el método más utilizado de secuenciación de ADN y se utilizó para secuenciar el primer genoma (un bacteriófago) en 1977 y por el Proyecto Genoma Humano.<sup>19,20</sup> La técnica se basa en agregar bases químicamente alteradas llamadas nucleótidos didesoxi junto con nucleótidos normales, generando la terminación aleatoria del ADN cuando se incorpora una base didesoxi. Esto da como resultado la producción de todos los fragmentos posibles de la secuencia objetivo. Los fragmentos se clasifican por su peso molecular. Cada base didesoxi está marcada con un tinte fluorescente que permite determinar la última base mediante un láser, produciendo una lectura ordenada de los nucleótidos presentes en la secuencia de ADN original.

En 1985, Kary Mullis desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR en sus siglas en inglés), una de las técnicas

centrales en biología molecular que permite la amplificación de una región específica de ADN usando nucleósidos trifosfatados y una polimerasa de ADN. La idea de multiplicar una hebra de ADN millones de veces la presentó en 1983, pero no convenció a sus colegas de la compañía CETUS. Mullis debió, entonces, demostrar por sí mismo la aplicabilidad de la técnica. La versión inicial, aunque eficaz, era poco eficiente, hasta el momento en que concibió la brillante ocurrencia de emplear polimerasas del ADN termoestables extraídas de microorganismos termofílicos (inicialmente la polimerasa llamada Taq, procedente de *Thermus aquaticus*).<sup>21</sup>

Esta literal “fotocopiadora del ADN” revolucionó la historia de la genómica y actualmente permite, a partir de muestras muy pequeñas de ADN, amplificar solo las regiones de interés y obtener resultados fiables. Un ejemplo de una de sus tantas aplicaciones es el área de la genética forense en la que los peritos logran suficiente cantidad de ADN a partir de ínfimas muestras recogidas en la escena del crimen con lo que se resuelven crímenes históricos, incluidos aquellos cometidos en el pasado distante.

En 2002, en la revista *Nucleic Acid Research*, Jan Schouten publica por primera vez la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*).<sup>22</sup> La amplificación de sondas tras ligación múltiple es un método de PCR múltiple utilizado para detectar números de copias anómalos en regiones conocidas del genoma que están asociadas con un trastorno genético específico. Es el método más fiable y económico para la detección de deleciones, duplicaciones y variaciones específicas en el número de copias (CNVs) conocidas. Es actualmente la técnica de elección en patologías con estos mecanismos involucrados como DMD (distrofia muscular de Duchenne) o DiGeorge, entre otros.

El MS-MLPA es una adaptación tecnológica del MLPA para la detección de cambios de metilación en el ADN asociados con trastornos

genéticos (la metilación es un fenómeno epigenético involucrado tanto en el silenciamiento de genes, hipermetilación, como en la activación de genes, hipometilación). Por ejemplo, el pseudohipoparatiroidismo IB se produce por una pérdida aislada de metilación en el exón A/B asociada con una deleción recurrente de 3 kb en el gen STX16 (20q13.32); ante la sospecha clínica de esta patología es de elección el MS-MLPA con el kit SALSA ME031® (MRC-Holland) que detecta tanto defectos de metilación como deleciones en STX16, así como deleciones que abarcan GNAS (causante de otros tipos de pseudohipoparatiroidismo).<sup>23</sup>

En el año 2004, la introducción de la tecnología de *arrays* cromosómicos (aCGH) permitió la expansión de un capítulo extensísimo de la genética médica como lo son tanto los síndromes de microdeleciones y microduplicaciones como los tumores originados por este tipo de rearrreglos. La tecnología de aCGH permite detectar cambios en el número de copias a través de todo el genoma con alta resolución y rapidez, y puede, además, ser implementada de forma automatizada en plataformas de alto rendimiento.<sup>24</sup>

El estudio cooperativo europeo sobre estandarización y aplicación de *microarrays* al diagnóstico de leucemias mieloides agudas que recoge el análisis de 3334 casos de leucemias y mielodisplasias en 11 laboratorios de 3 continentes confirma que un 91% de los diagnósticos de subtipos de leucemia (leucemias causadas por genes de fusión) son detectados mediante *microarrays* de expresión.<sup>25</sup>

El costo de un análisis de cariotipo convencional es muy inferior al de un *microarray*. Pasar de diagnosticar un 7% (cariotipo) a un 22% (aCGH) de los pacientes triplica el costo de la prueba. Sin embargo, el costo por resultado patológico o diagnóstico es prácticamente igual en el cariotipo convencional (931 euros) que en los aCGH (1979 euros). En pocas palabras, triplicar el número de diagnósticos (pasar de 7 a 22%) significa un incremento del 1% en el costo por diagnóstico.<sup>26</sup>



### La revolución de la genómica

El 26 de junio de 2000, el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano anunció la producción de un borrador de la secuencia del genoma humano. Este anuncio se hizo oficial desde la casa Blanca de Estados Unidos con declaraciones del entonces presidente Bill Clinton y los investigadores Tony Blair, Francis Collins y Craig Venter. En abril de 2003, este consorcio anunció una versión esencial terminada de la secuencia del genoma humano con 400 vacíos y el 92 por ciento del genoma identificado con un índice de exactitud de menos de un error por cada 10.000 pares de bases. Sin embargo, mucho se ha recorrido desde ese anuncio que a menudo recordamos. Ese primer “mapa” borrador de nuestro genoma humano fue, sin embargo, prácticamente lo más parecido a un mapa en blanco, con muy pocas coordenadas; es decir, se daba a conocer al público la secuencia de nucleótidos pero aún era muy poco lo que se conocía acerca del significado de esa secuencia. Fueron años de investigación y esfuerzos colectivos permanentes los que hacen que este apasionante mapa cada vez logre una mayor definición y una mejor interpretación de su complejo funcionamiento.

La primera secuenciación masiva en paralelo (secuenciar muchos genes al mismo tiempo) que se realizó en el ámbito de la investigación en septiembre de 2001 costó 100 millones de euros; era una tecnología factible pero económicamente inaccesible desde el punto de vista sanitario. Desde septiembre de 2001 hasta principios de 2020 los costos de la secuenciación masiva paralela descendieron un 100.000%; no existe otra tecnología que haya sufrido esta disminución de costos. La realidad es que hoy los hospitales pueden ofrecer estas tecnologías no solo porque están disponibles sino simplemente porque es factible pagarlas. El surgimiento de métodos basados en la secuenciación del genoma ha revolucionado la medicina moderna otorgándole una herramienta notable

para abordar el diagnóstico de enfermedades poco frecuentes.<sup>27</sup>

En el año 2011 se introdujo en la clínica la secuenciación masiva en paralelo. La secuenciación masiva (NGS: *Next generation sequencing*) puede analizar simultáneamente desde unos pocos hasta cientos de genes, el exoma completo e incluso el genoma completo, lo que muestra ser un avance significativo hacia el desciframiento de la heterogeneidad genética de las enfermedades raras y permite las investigaciones de genes, que se extiende más allá de la hipótesis clínica.<sup>28</sup>

La tecnología de NGS ha contribuido significativamente a la identificación de genes. Hasta 1986 se había identificado solo un número aproximado de 40 genes responsables de enfermedades genéticas. La clonación posicional, que incluía mapear el gen en el genoma, clonando la región de interés y secuenciando los genes candidatos, llevaron a la identificación de más de 1000 genes, incluidos los de la fibrosis quística y enfermedad de Huntington.<sup>29,30</sup> Sin embargo, después de la primera aplicación exitosa de NGS para la identificación de genes en 2010,<sup>31</sup> el número de genes asociados con trastornos mendelianos humanos aumentó exponencialmente, y, para el año 2017, el 87% de los genes descubiertos resultaron del uso de este método específico.<sup>32</sup>

En los últimos 20 años, los sistemas de salud fueron testigos de esta explosión en las habilidades diagnósticas, y paralelamente –a medida que se fueron conociendo las causas de las enfermedades poco frecuentes– la investigación abrió nuevos horizontes en sus tratamientos. Los servicios de salud debieron “aggiornarse” para ser capaces de dar una adecuada respuesta a la población de pacientes con enfermedades genéticas.

El rendimiento diagnóstico de WES (*Whole exome sequencing*) para diversas enfermedades heterogéneas alcanza hasta el 40% en estudios poblacionales a gran escala, mientras que en poblaciones consanguíneas el rendimiento diagnóstico llega hasta un 80%.<sup>33</sup>

Algunos estudios limitados a ciertas categorías de enfermedades genéticas reportan réditos diagnósticos entre 40 y 70% según la patología genética.

Entre grupos de pacientes con una discapacidad intelectual inexplicable o retraso en el desarrollo, el rendimiento utilizando una prueba tradicional como el cariotipo clásico no excedió el 10% y, en una mejora adicional del 20% en el diagnóstico, el rendimiento fue proporcionado por la hibridación genómica comparativa (aCGH), que detecta variantes del número de copias genómicas,<sup>34</sup> mientras que NGS-SR (*Next Generation Sequencing-Shorts Reads*) mejoró la eficacia diagnóstica hasta en un 62%.<sup>35</sup>

Todas estas técnicas permitieron que, en solo 20 años, nuestra habilidad diagnóstica de principios de 2000 crezca desde un 20% de patologías con diagnóstico conocido hasta un 60% de patologías genéticas con diagnóstico molecular conocido a finales del año 2020.

### **Hacia dónde vamos: nuevas tecnologías en la frontera**

Las tecnologías de hibridación genómica comparativa aCGH y NGS se han convertido en una herramienta de diagnóstico de rutina para la genética médica moderna y han revolucionado el descubrimiento de nuevos genes en enfermedades mendelianas.<sup>27</sup>

A pesar de esto, dichas tecnologías tienen sus limitaciones, entre otros aCGH detecta variantes estructurales (*SV Structural variants*) de hasta 45 Kpb y el *array* de SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*) puede detectar disomía uniparental pero no detecta rearrreglos balanceados.

En el año 2021, la revista *American Journal of Medical Genomics* publicó dos artículos que presentaron por primera vez la tecnología de mapeo óptico genómico (OGM del inglés: *Optical Genome Mapping*). OGM es comparable a aCGH en términos de resolución para detectar SV. La ventaja de OGM sobre aCGH

es la capacidad de detectar SV equilibrados, localizar material adicional y potencialmente localizar puntos de interrupción en alta resolución.<sup>36</sup> Este es un beneficio significativo en el diagnóstico clínico, ya que se ha demostrado que los rearrreglos estructurales equilibrados contribuyen significativamente a las anomalías congénitas al alterar genes e interacciones regulatorias de largo alcance.<sup>37</sup>

Por otro lado, a pesar de los numerosos avances que ha conferido NGS de primera y segunda generación, muchos estudios todavía se ven obstaculizados por las longitudes de lectura cortas (~150-300 pb) que las tecnologías NGS actuales utilizan para preservar una alta calidad de lectura.<sup>38</sup> Los problemas que surgen del uso de lecturas breves pueden atribuirse principalmente a la naturaleza altamente repetitiva y compleja del genoma humano.<sup>39</sup>

Se ha demostrado que, a pesar del uso de algoritmos bioinformáticos sofisticados, a menudo es imposible mapear con precisión, o incluso ensamblar, lecturas cortas que se originan en regiones que albergan variación estructural (SV), secuencias repetitivas, contenido repetitivo de guanina-citosina (GC) o secuencias con múltiples elementos homólogos dentro del genoma.<sup>40</sup> Esto introduce errores al denominar variantes genéticas y la incapacidad de capturar ciertas regiones genómicas. Además, con NGS de lectura corta (SR-NGS), la información sobre las fases de las variantes a menudo se pierde,<sup>41</sup> y el análisis de los datos depende en gran medida de los genomas de referencia, que se sabe que son imperfectos. La dependencia del genoma de referencia es especialmente problemática para la detección de SNP en regiones genómicas complejas que pueden ser altamente específicas de un individuo o de una población.<sup>42</sup>

Para la detección de deleciones extensas, duplicaciones y reordenamientos genómicos más grandes, los enfoques SR-NGS (SR-*Short reads-Next generation sequencing*) a menudo carecen de sensibilidad, muestran un exceso



de falsos positivos y no logran definir los SV complejos. Sin embargo, los SV de > 50 pb de tamaño son una fuente importante de variación genética y representan la mayor cantidad de bases divergentes en los genomas humanos. Además, actualmente se ha demostrado que hasta el 89% de la variación identificada, consiste principalmente en SV; esto se había omitido en el proyecto de los 1000 genomas.<sup>43,44</sup>

Varios estudios recientes muestran un aumento siete veces mayor en la detección de SV mediante un enfoque multiplataforma, incluido LRS (*Long-read sequencing*, o secuenciación de tercera generación), en comparación con los métodos SR-NGS estándar.<sup>45</sup> Es probable que esta ganancia en la sensibilidad de detección de SV se deba a la propia tecnología de secuenciación diferente, ya que se beneficia de fragmentos más largos, sin PCR y con menos sesgo de secuencia.

La detección de SV mediante SR-NGS es indirecta y se basa en coberturas de profundidad de lectura y el uso de lecturas de extremos emparejados, para las cuales se conoce la longitud aproximada entre pares de lectura. Para las variantes del número de copias (CNV), el exceso de lecturas puede indicar una amplificación, mientras que la pérdida de lecturas sugiere una eliminación. Los reordenamientos se pueden descubrir utilizando lecturas de extremos emparejados investigando las desviaciones en las distancias y orientaciones esperadas entre pares de lecturas.<sup>46</sup> A diferencia de SR-NGS, es más probable que las lecturas largas obtenidas con los secuenciadores PacBio u ONT abarquen los puntos de interrupción del SV o, a menudo, todo el evento SV, con alineaciones de alta confianza. Además, las lecturas más largas pueden alinearse con mayor confianza con secuencias repetitivas que a menudo median en la formación de SV. Las lecturas largas también permiten una mejor distinción de los haplotipos, lo que contribuye aún más a la precisión del análisis de los SV.<sup>47</sup> Tradicionalmente se han utilizado otros métodos, como el número

de copias de *microarrays* y el cariotipo, para detectar enfermedades que causan SV. Sin embargo, con estos enfoques no es posible mapear SV pequeñas o no desbalanceadas, y no proporcionan precisión en la resolución de pares de bases, ni la posibilidad de resolver SV complejas. Por lo tanto, LRS puede aumentar sustancialmente la resolución y fiabilidad de la detección y el mapeo de SV.<sup>48</sup>

Otra ventaja de LRS es la posibilidad de detectar mutaciones dinámicas con expansión o contracción del número de copias. Una repetición corta en tándem es una región de ADN genómico con múltiples copias adyacentes de unidades de secuencia cortas (1 a 6 pb). Estas regiones repetidas son altamente mutables debido a errores de replicación que ocurren durante las divisiones celulares, y, hasta la fecha, se sabe que más de 30 enfermedades humanas son causadas por expansiones repetidas en tándem o contracciones repetidas.<sup>49</sup> Desde su descubrimiento, la investigación de expansiones repetidas en tándem se diagnostica mediante técnicas moleculares estándar como la clonación, la PCR, *southern blot*.<sup>50</sup>

La mayoría de las expansiones que causan enfermedades son más largas que las lecturas NGS utilizadas actualmente, lo que hace prácticamente imposible ensamblarlas con precisión. Múltiples estudios han demostrado que las tecnologías LRS son adecuadas para trascender a través de estas expansiones repetidas largas, a menudo ricas en GC. Esto no solo permite la detección directa de las longitudes de expansión, sino también la variación de la secuencia intramolécule, lo que podría proporcionar información adicional clínicamente relevante.<sup>51</sup>

### ***Dónde estamos: escenario mundial y diagnóstico genético por procesos***

En 2003, el Proyecto Genoma Humano finalizó con la generación de una secuencia prácticamente completa del genoma humano (una secuencia de nucleótidos de una calidad notablemente alta que estaba casi completa,

representando aproximadamente el 92% del genoma humano). El ~8% restante resultó ser particularmente difícil de secuenciar, porque estas regiones contenían ADN altamente repetitivo y las tecnologías en ese momento no estaban a la altura para poder resolver esos espacios vacíos.

El 1 de abril de 2022, el consorcio Telomere-to-Telomere (T2T) publicó una colección de artículos con la primera secuencia verdaderamente completa del genoma humano. La secuencia (más de 3 mil millones de pares de bases de largo en 23 cromosomas) no tiene ningún espacio. El consorcio T2T utilizó además esta secuencia genómica recién completada como referencia para descubrir más de dos millones de variantes genómicas adicionales. Esta información es valiosa para obtener una visión integral de cómo varían los genomas humanos, y para investigar cómo estas variantes recién descubiertas influyen en la salud y la enfermedad.<sup>52</sup>

En este escenario mundial, un servicio de Genética que en la actualidad se precie de funcionar bien debiera poder dar respuesta a estudios cromosómicos y de citogenética molecular (cariotipo, FISH, SKY), estudios de ADN (aCGH, array de SNP, microsatélites, PCR, OMG, secuenciación de Sanger, paneles [NGS], exomas [SR-NGS], genomas [LRS]), estudios de ARN (*northern blot*, PCR cuantitativa, transcriptoma) y estudios epigenéticos (estudios de metilación, metil-seq[NGS], metil-arrays).<sup>53</sup>

El contexto en la Argentina en el año 2025 es algo más precario de este ideal: en la práctica habitual quienes abordan el manejo diario de pacientes con enfermedades de etiología genética, pocas excepcionales veces cuentan con la posibilidad de realizar un diagnóstico por secuenciación de tercera generación (LRS) o mapeo óptico genómico (OMG), y esto implica enviar ADN al exterior. El diagnóstico correcto de estos pacientes exige una alta sospecha clínica, un conocimiento profundo de la patología y de los mecanismos mutacionales involucrados a fin de prescindir de

tecnologías de alto costo y rendimiento y lograr diagnóstico con tecnologías más asequibles y disponibles en nuestro país.

Parte de la complejidad de estas patologías proviene de su heterogeneidad genética y clínica. El fenotipo exacto o similar puede ser asociado con diferentes mecanismos genéticos, mientras que la heterogeneidad clínica se refleja en el hecho de que la misma mutación o las mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a diferentes fenotipos de enfermedades.<sup>54</sup>

Genetistas y especialistas que conocen los mecanismos involucrados en cada patología y las pruebas genéticas disponibles en el medio local realizan el llamado “diagnóstico genético por procesos”: para ello es crucial tener la hipótesis diagnóstica correcta para fin de realizar, sobre esa base, un algoritmo diagnóstico eficiente y costo-efectivo para el paciente. No siempre NGS es la primera opción. Se elegirá un cariotipo convencional cuando se buscan anomalías cromosómicas numéricas o estructurales de más de 5-10 MB, se optará por FISH (límite de resolución 1-5 MB) o QPCR (Quick PCR) cuando hay poco tiempo para tomar decisiones y se buscan secuencias conocidas *locus* específicas. Se optará por PCR o *southern blot* a la hora de buscar mutaciones dinámicas por expansión o contracción de tripletes. Un MS-MLPA será la opción más acertada cuando el equipo médico piensa en un pseudohipoparatiroidismo IB u otra patología que involucre genes sometidos a metilación epigenética.

Si la etiología más frecuente de una patología son los rearrreglos estructurales extensos, es incorrecto iniciar el estudio con EXOMA o paneles que difícilmente detecten el SV.

El tratamiento de las EPF exige un diálogo permanente del caso entre especialistas clínicos, genetistas clínicos, biólogos moleculares y bioinformáticos obligando a los equipos a ser estrategias permanentes en la trinchera del diagnóstico, aun en países en los que el acceso a tecnologías de última generación es asequible.



## Conclusión

La ciencia ha desplegado frente a nuestros ojos el código del mapa más fascinante que podemos imaginar: las instrucciones del funcionamiento de la vida humana. Es apasionante ver cómo la comunidad científica en el último siglo ha corrido y corre esta carrera de postas para su conocimiento, desciframiento, comprensión y finalmente para poder, algún día, diagnosticar y, por qué no, curar todas las enfermedades genéticas.

A pesar del salto significativo en el diagnóstico de enfermedades genéticas poco frecuentes en los últimos años, todavía hoy cerca de la mitad de los pacientes con sospecha de una enfermedad genética rara permanece sin un diagnóstico definitivo.<sup>55</sup>

Se estima que 200 millones de personas en todo el mundo viven con una enfermedad genética no resuelta, pero probablemente el número sea aún más significativo debido al no reconocimiento de esas enfermedades.

Los pacientes no diagnosticados con enfermedades genéticas son un grupo particularmente vulnerable con necesidades específicas insatisfechas.

Pacientes con enfermedades genéticas no diagnosticadas o con diagnósticos tardíos pueden tener un retraso para el inicio de un tratamiento específico, que, a su vez, podría tener consecuencias irreversibles en su salud; la falta de diagnóstico impide la toma de elecciones reproductivas y causa un gran estrés a los pacientes y sus familias.

Los enfoques emergentes provenientes de entornos de investigación, como la secuenciación de genoma de lecturas largas y el mapeo genómico óptico, muestran un gran potencial para mejorar la identificación de variantes genéticas causales de enfermedades. Además, nuevas tecnologías ómicas que miden el transcrito, el epigenoma, el proteoma o el metaboloma están demostrando un gran potencial para la interpretación de variantes.<sup>56,57</sup>

Para finalizar, las enfermedades genéticas ocurren en todos los campos de la medicina; por lo tanto, la educación, la formación continua y el abordaje multidisciplinario de esta área del conocimiento, en vertiginoso crecimiento, es esencial para la correcta interpretación de los hallazgos que puedan surgir.

Un elemento importante en el futuro es que los genetistas clínicos desempeñan un papel clave en la educación de profesiones no genéticas; de hecho, en el mundo de la ciencia, “el arte de enseñar es ayudar a los demás a comprender”.<sup>58</sup>

**Conflicto de intereses:** la autora declara no tener conflicto de intereses.

**Financiamiento:** la autora declara que no ha recibido ningún financiamiento o apoyo económico para la realización de este estudio y la preparación de este artículo.

Recibido: febrero 2025

Aceptado: mayo 2025

## Referencias

1. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.*2020;28:165-73. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
2. Vinkškel M, Writzl K, Maver A, Peterlin B. Improving diagnostics of rare genetic diseases with NGS approaches. *J Community Genet.* 2021;12(2):247-56. doi:10.1007/s12687-020-00500-5.

3. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, et al. Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health*. 2015;18(6):906-14. doi:10.1016/j.jval.2015.05.008.
4. Garrod AE. The Incidence of alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality. 1902 *The Lancet*. 1996; 160(Issue 4137): 1616-20. ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)41972-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)41972-6).
5. Boveri T. Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Jena: G. Fischer: 1904. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.28064>.
6. Sutton WS. The chromosomes in heredity. *Biol Bull- US*. 1903; 4:231-51.
7. <https://www.genome.gov/>
8. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas*. 1956; 42:1-6.
9. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Les chromosomes somatique des enfants mongoliens. *Comptes Rend Acad Sci Paris*. 1959;248:1721.
10. Caspersson T, Zech L, Modest EJ, et al. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*. 1969;58:141-52.
11. Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*. 1970;60:315-9.
12. Ferguson-Smith M.A. History and evolution of cytogenetics. *Mol Cytogenet*. 2015;8:19. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0125-8>
13. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-3.
14. Zhang C-Z, Leibowitz ML, Pellman D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes Dev*. 2013;27:2513-30.
15. Schreppers-Tijdink GA, et al. A systematic cytogenetic study of a population of 1.170 mentally retarded and/or behaviorly disturbed patients including fragile X – screening. *J Genet Hum* 1988; 36:425-46.
16. Harper ME, Ullrich A, Saunders GF. Localisation of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1981;78:4458-60.
17. Malcolm S, Barton P, Murphy CST, Ferguson-Smith MA. Chromosomal localisation of a single copy gene by in situ hybridisation: human beta-globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet*. 1981;45:135-41.
18. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridisation. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1986;83:2934-8.
19. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1977;74(12):5463-7. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
20. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome [published correction appears in *Nature* 2001;412(6846):565] [published correction appears in *Nature* 2001;411(6838):720. Szustakowki, J [corrected to Szustakowski, J]]. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. doi:10.1038/35057062.
21. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239 (4839):487-91. PMID 2448875. doi:10.1126/science.2448875.
22. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57. doi: 10.1093/nar/gnf056. PMID: 12060695; PMCID: PMC117299.
23. Fernández-Rebollo E, Lecumberri B, Garin I, et al. New mechanisms involved in paternal 20q disomy associated with pseudohypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2010;163: 953-62.
24. Cigudosa J, Lapunzina P (coord.). Consenso



- para la implementación de los Arrays (CGH Y SNParrays) en la Genética Clínica. 2012.
25. Kohlmann A, Kipps TJ, Rassenti LZ, et al. An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in Leukemia study prephase. *Br J Haematol.* 2008;142(5):802-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07261.x. PMID: 18573112; PMCID: PMC2654477.
  26. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-64. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
  27. Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, et al. Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *Biomed Res Int.* 2015;2015:461524.
  28. Martínez F, Caro-Llopis A, Roselló M, et al. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J Med Genet.* 2017;54(2):87-92. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103964.
  29. Collins FS. Identifying human disease genes by positional cloning. *Harvey Lect.* 1990;86:149-64.
  30. Lipner EM, Greenberg DA. The Rise and Fall and Rise of Linkage Analysis as a Technique for Finding and Characterizing Inherited Influences on Disease Expression. *Methods Mol Biol.* 2018;1706:381-97. doi:10.1007/978-1-4939-7471-9\_21.
  31. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010;42(1):30-5. doi:10.1038/ng.499.
  32. Bamshad MJ, Nickerson DA, Chong JX. Mendelian gene discovery: fast and furious with no end in sight. *Am J Hum Genet.* 2019;105:448-55.
  33. Retterer K, Juusola J, Cho MT, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med.* 2016;18(7):696-704. doi:10.1038/gim.2015.148.
  34. Jang W, Kim Y, Han E, et al. Chromosomal Microarray Analysis as a First-Tier Clinical Diagnostic Test in Patients With Developmental Delay/Intellectual Disability, Autism Spectrum Disorders, and Multiple Congenital Anomalies: A Prospective Multicenter Study in Korea. *Ann Lab Med.* 2019;39(3):299-310. doi:10.3343/alm.2019.39.3.299.
  35. Al-Dewik N, Mohd H, Al-Mureikhi M, et al. Clinical exome sequencing in 509 Middle Eastern families with suspected Mendelian diseases: The Qatari experience. *Am J Med Genet A.* 2019;179(6):927-35. doi:10.1002/ajmg.a.61126.
  36. Dremsek P, Schwarz T, Weil B, et al. Optical Genome Mapping in Routine Human Genetic Diagnostics-Its Advantages and Limitations. *Genes (Basel).* 2021;12(12):1958. doi: 10.3390/genes12121958. PMID: 34946907; PMCID: PMC8701374.
  37. Redin C, Brand H, Collins RL, et al. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. *Nat Genet.* 2017;49(1):36-45. doi:10.1038/ng.3720
  38. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51. doi:10.1038/nrg.2016.49.
  39. de Koning AP, Gu W, Castoe TA, et al. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.* 2011;7(12):e1002384. doi:10.1371/journal.pgen.1002384.
  40. Salzberg SL, Yorke JA. Beware of mis-assembled genomes. *Bioinformatics.* 2005;21(24):4320-1. doi:10.1093/bioinformatics/bti769.
  41. Delaneau O, Howie B, Cox AJ, et al. Haplotype estimation using sequencing reads. *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):687-96. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.09.002. PMID:

- 24094745; PMID: PMC3791270.
42. Chaisson MJ, Wilson RK, Eichler EE. Genetic variation and the de novo assembly of human genomes. *Nat Rev Genet.* 2015;16(11):627-40. doi:10.1038/nrg3933.
43. Huddleston J, Chaisson MJP, Steinberg KM, et al. Discovery and genotyping of structural variation from long-read haploid genome sequence data [published correction appears in *Genome Res.* 2018;28(1):144. doi: 10.1101/gr.233007.117.]. *Genome Res.* 2017;27(5):677-85. doi:10.1101/gr.214007.116
44. Sedlazeck FJ, Rescheneder P, Smolka M, et al. Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat Methods.* 2018;15(6):461-8. doi:10.1038/s41592-018-0001-7.
45. Chaisson MJP, Sanders AD, Zhao X, et al. Multi-platform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. *Nat Commun.* 2019;10(1):1784. Published 2019 Apr 16. doi:10.1038/s41467-018-08148-z.
46. Tattini L, D'Aurizio R, Magi A. Detection of Genomic Structural Variants from Next-Generation Sequencing Data. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:92. doi: 10.3389/fbioe.2015.00092. PMID: 26161383; PMCID: PMC4479793.
47. Cretu Stancu M, van Roosmalen MJ, Renkens I, et al. Mapping and phasing of structural variation in patient genomes using nanopore sequencing. *Nat Commun.* 2017;8(1):1326. Published 2017 Nov 6. doi:10.1038/s41467-017-01343-4.
48. Mantere T, Kersten S, Hoischen A. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet.* 2019;10:426. Published 2019 May 7. doi:10.3389/fgene.2019.00426.
49. Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Balog J, et al. Deep characterization of a common D4Z4 variant identifies biallelic DUX4 expression as a modifier for disease penetrance in FSHD2. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(1):94-106. doi:10.1038/s41431-017-0015-0.
50. Loomis EW, Eid JS, Peluso P, et al. Sequencing the unsequenceable: expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene. *Genome Res.* 2013;23(1):121-8. doi:10.1101/gr.141705.112.
51. Ardui S, Race V, de Ravel T, et al. Detecting AGG Interruptions in Females with a FMR1 Premutation by Long-Read Single-Molecule Sequencing: A 1 Year Clinical Experience. *Front Genet.* 2018;9:150. Published 2018 May 16. doi:10.3389/fgene.2018.00150.
52. <https://www.genome.gov/about-genomics/telomere-to-telomere>
53. Lapunzina, P. Conferencia Neurogenética Fundación querén. Madrid; noviembre de 2020.
54. Rahit KMTH, Tarailo-Graovac M. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes (Basel).* 2020;11(3):239. Published 2020 Feb 25. doi:10.3390/genes11030239.
55. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med.* 2018;3:16. Published 2018 Jul 9. doi:10.1038/s41525-018-0053-8.
56. Kernohan KD, Boycott KM. The expanding diagnostic toolbox for rare genetic diseases. *Nat Rev Genet.* 2024;25(6):401-15. doi: 10.1038/s41576-023-00683-w. Epub 2024 Jan 18. PMID: 38238519.
57. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet A.* 2019;179(6):885-92. doi: 10.1002/ajmg.a.61124. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30883013.
58. McClaren BJ, Crellin E, Janinski M, et al. Preparing Medical Specialists for Genomic Medicine: Continuing Education Should Include Opportunities for Experiential Learning. *Front Genet.* 2020;11:151. Published 2020 Mar 3. doi:10.3389/