

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**EXPERIENCIA CLÍNICA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ EN PACIENTES CON ANÁLISIS POR
TÉCNICA DE FISH PARA del22q11.2 DEL 2005 AL 2008**

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DR. ARTURO FLORES CUEVAS

TUTOR: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESOR: DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

MEXICO, D.F.

FEBRERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

Tutor de Tesis

Jefe del Departamento de Genética

Hospital Infatnil de México Federico Gómez

DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

Asesor de Tesis

Medico Ádscrito al Departamento de Genética

Hospital Infantil de México Federico Gómez

DRA. YOLANDA ROCÍO PEÑA ALONSO

Director de Enseñansza y Desarrollo Académico

Hospital Infantil de México Federico Gómez

A mi mamá Ma. Guadalupe por su amor
y esfuerzo para darme una profesión...

AGRADECIMIENTOS

- A mis papas: Laura, Ricardo y Luis por su cariño y consejos durante todos estos años.
- A mis hermanos Adriana, Rocío y Omar
- A mis tíos Alfredo y Sergio por todo el apoyo que me han dado.
- A Aries por todo tu amor y apoyo en el tiempo que llevamos juntos.
- A Christopher, Hermes, Iván, José Luis y Mauricio por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.
- A la Dra. Verónica F. Morán Barroso por su apoyo y confianza durante estos tres años.
- A los médicos adscritos al Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez por haber sido mis maestros y compartir conmigo su experiencia y conocimiento.
- A mis compañeros residentes gracias por su apoyo y amistad.
- Al personal de laboratorio de Citogenética y Biología Molecular.

ÍNDICE

RESUMEN	7
I.- INTRODUCCIÓN	
I.1.- Alteraciones cromosómicas	9
I.2.- Embriología de los arcos y bolsas faríngeas	11
I.3.- Embriología del corazón y desarrollo de los arcos faríngeos	14
II.- ANTECEDENTES	
II.1.- Microdelección 22q11.2	18
II.1.1.- Manifestaciones clínicas	18
II.1.2.- Cardiopatías congénitas	23
II.1.3.- Incidencia	25
II.1.4.- Bases moleculares	27
II.1.5.- Genes candidatos	30
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
IV.- JUSTIFICACIÓN	34
V.- OBJETIVO GENERAL	
V.1.- Objetivos Particulares	34
VI.- VARIABLES	
VI.1.- Variables independientes	35
VI.2.- Variables dependientes	35
VII.- TIPO DE ESTUDIO	35

VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS	
VIII.1.- Criterios de selección	36
VIII.1.1.- Criterios de inclusión	36
VIII.1.2.- Criterios de exclusión	37
VIII.1.3.- Criterios de eliminación	37
VIII.2.- Métodos	
VIII.2.1.- Análisis clínico	37
VIII.2.2.- Técnica de FISH	37
IX.- RESULTADOS	41
X.- DISCUSIÓN	48
XI.- BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN

Las malformaciones congénitas afectan hasta 3 de cada 1000 RNV y algunas están asociadas a alteraciones cromosómicas (AC), las cuales pueden ser numéricas o estructurales y pueden involucrar uno o más cromosomas autosómicos, sexuales o ambos. Las deleciones autosómicas citogenéticamente visibles tienen una incidencia aproximada de 1 en 7000 RNV. El síndrome velocardiofacial (SVCF) se describió por primera vez en 1978 y se considera uno de los síndromes por microdelección más comunes con una frecuencia estimada de 1 en 4000 nacidos vivos. En más de 80% de los casos los pacientes con SVCF tienen una deleción del cromosoma 22 en el brazo largo en la región 1 banda 1 subbanda 2 (del22q11.2). Las cardiopatías congénitas aisladas también han sido relacionadas con la del22q11.2 como es el caso de la tetralogía de Fallot (TF) en la que la del22q11.2 se encuentra presente en 6 a 35% de los casos.

Las principales características clínicas de los pacientes con la del22q11.2 son dismorfias faciales caracterizadas por cara alargada raíz nasal prominente, punta nasal bulbosa, hipertelorismo, telecanto, fisuras palpebrales estrechas comisuras paladar alto o hendido y dsimorfia de pabellones auriculares; incompetencia velo faríngea, cardiopatía congénita, problemas del aprendizaje y voz nasal.

Por su alta frecuencia reportada mundialmente y al no existir estos estudios publicados en nuestro país surge la pregunta sobre cual es la frecuencia de la del22q11.2 en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez con diagnóstico clínico de SVCF o TF aislada así como de conocer la correlación genotipo- fenotipo. Se realizó un estudio descriptivo, transversal, observacional y ambilectivo en el cual se incluyeron 17 pacientes con diagnóstico de TF aislada y 24 con diagnóstico clínico de SVCF que acudieron entre 2005 y 2008. Se tomo muestra de sangre periférica para realizar cariotipo convencional con bandas GTG y análisis por técnica de FISH para del22q11.2.

De los pacientes con diagnóstico de TF 53% fueron hombres y 47% mujeres mientras que 41.7% de aquellos con SVCF fueron hombres y 58.3% mujeres. Todos los pacientes con

SVCF tuvieron dismorfias faciales distintivas y 8 de los casos con diagnóstico de TF presentaron alguna dismorfia facial mientras que 3 de éstos tuvieron más de una característica asociada.

En relación al diagnóstico por la técnica de FISH 6 (25%) de los 24 pacientes con diagnóstico de SVCF tuvieron del22q11.2 mientras que sólo 1 (5.88%) de aquellos con TF tuvieron la delección. Estos resultados contrastan con lo publicado en la literatura universal que reporta una frecuencia de la del22q11.2 de más de 90% en pacientes con SVCF lo que podría asociarse con el tamaño de la muestra o bien a que la causa sea otra por ejemplo por mutaciones puntuales en el gen *TBX1* el cual ha sido asociado a SVCF. En base a los resultados clínicos y citogenéticos se otorgó asesoramiento genético a estas familias.

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las malformaciones congénitas afectan hasta 3 de cada 1000 Recién nacidos vivos (RNV) (Stevenson R, 1993) algunas están asociadas a alteraciones cromosómicas (AC). Las anomalías cromosómicas son numéricas o estructurales y pueden involucrar uno o más cromosomas autosómicos, sexuales o ambos. Las AC estructurales representan 4% de las cromosopatías en los productos de aborto del primer trimestre, 15 % de los de segundo trimestre y 40 % de las alteraciones cromosómicas de los RNV. (Moore C, 2001; Nussbaum R, 2001) Los rearrreglos estructurales resultan de rompimiento cromosómico y pueden originarse de diversas maneras, estando presentes en uno de cada 400 RNV. (Moore C, 2001; Nussbaum R, 2001) Las rupturas cromosómicas pueden ocurrir espontáneamente o bien pueden ser inducidas por agentes externos y dan lugar a alteraciones del tipo de deleciones (terminal e intersticial), inversiones, translocaciones (recíprocas o robertsonianas) e inserciones. (Moore C, 2001; Morrow J, 2005; Savage, 2001)

Los rearrreglos estructurales se pueden dividir en balanceados, aquellos en los que los cromosomas a pesar de la alteración en su estructura conservan el material cromosómico sin afectar la función de los genes involucrados, y no balanceados aquellos en los que hay material cromosómico adicional o faltante. (Moore C, 2001; Nussbaum R, 2001; Savage, 2001) Es dentro de los rearrreglos estructurales no balanceados donde se clasifica a las deleciones, éstas involucran la pérdida de un segmento cromosómico, lo que generaría un individuo con únicamente la mitad de la información genética correspondiente a ese segmento cromosómico. (Nussbaum R, 2001) Las consecuencias clínicas de esta situación se reflejan como haploinsuficiencia la cual se define como la incapacidad de una copia del material genético para llevar a cabo las funciones normales realizadas por las dos copias o alelos. (Nussbaum R, 2001)

Las deleciones autosómicas citogenéticamente visibles (Fig.1) tienen una incidencia aproximada de 1 en 7000 RNV y se pueden originar por:

- 1) Ruptura cromosómica y pérdida del segmento acéntrico
- 2) Recombinación desigual entre cromosomas homólogos mal alineados o bien entre cromátidas hermanas. (Moore C, 2001; Nussbaum R, 2001)

Las técnicas de bandeado de alta resolución y de FISH (Hibridación *In situ* Fluorescente) pueden evidenciar la presencia de una deleción que sea demasiado pequeña para ser detectada por el poder de resolución de la técnica habitual de bandas GTG y en general su tamaño es de 2000 a 3000 kb. (Nussbaum R, 2001)

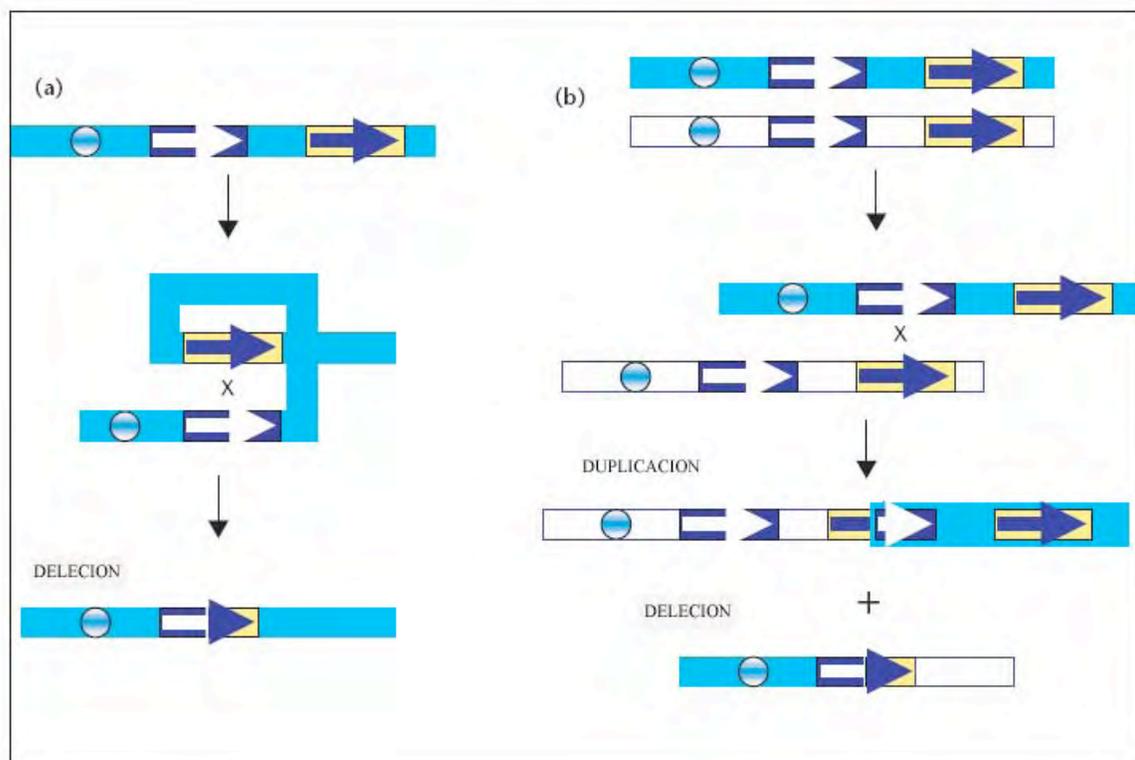


FIGURA 1. Modelos para explicar la formación de las deleciones. Eventos de recombinación homóloga (RH) que involucran regiones específicas de repetidos de bajo número de copias (LCRs). Fig. a) Eventos de RH entre dos LCRs pueden generar una deleción por excisión de un aro intracromátide. Fig. b) Eventos de RH entre dos LCRs de cromosomas homólogos pueden generar una duplicación y una deleción. (Modificado de Morrow, B. 2005)

Entre las alteraciones cromosómicas estructurales más frecuentes se encuentra la microdelección 22q11.2 (del22q11.2) que se estima tiene una incidencia de 1 en 4000 RNV. (Carlson C, 1997; Scambler P, 2000; Yamagishi H. 2002) Es interesante que desde 1955 se han descrito varios casos de enfermedades aparentemente distintas que tienen un fenotipo muy parecido y que hoy día se sabe también presentan la del22q11.2 como AC lo que ha originado la consideración de que probablemente todos estos padecimientos representan el espectro clínico de una misma AC. (Carlson C, 1997; Scambler P, 2000; Yamagishi H. 2002)

I.2- EMBRIOLOGÍA DE LOS ARCOS Y BOLSAS FARÍNGEAS

Las principales estructuras afectadas en pacientes con la del22q11.2 son los derivados embrionarios de los arcos y bolsas faríngeas, lo que constituye un defecto primario en el desarrollo del aparato faríngeo. Los arcos faríngeos, estructuras compuestas por diferentes tipos celulares, son bilaterales y simétricos y se desarrollan en forma segmentaria a lo largo del eje antero-posterior del embrión. Cada arco tiene una cubierta externa de ectodermo, una capa interna de endodermo y un núcleo central de mesodermo paraxial que se encuentra adyacente a una arteria del arco faríngeo. (Scambler P, 2000) (Fig.2 y Fig.3)

Estas estructuras están en relación con las células de la cresta neural cefálica, las cuales migran del pliegue neural a cada arco faríngeo en donde formarán el mesénquima que a su vez rodeará a las arterias de ese arco y al núcleo mesodérmico (Fig.4). El mesodermo da origen a los músculos de cara y cuello mientras que el mesénquima contribuirá a formar las estructuras óseas de la cara así como a las estructuras cardiovasculares. Las bolsas faríngeas formadas por la capa epitelial derivada del endodermo darán origen al timo y las glándulas paratiroides. Por otra parte, las hendiduras faríngeas formadas por la capa epitelial derivada del ectodermo darán lugar a la epidermis y a las neuronas sensoriales del ganglio neural asociado al arco faríngeo.

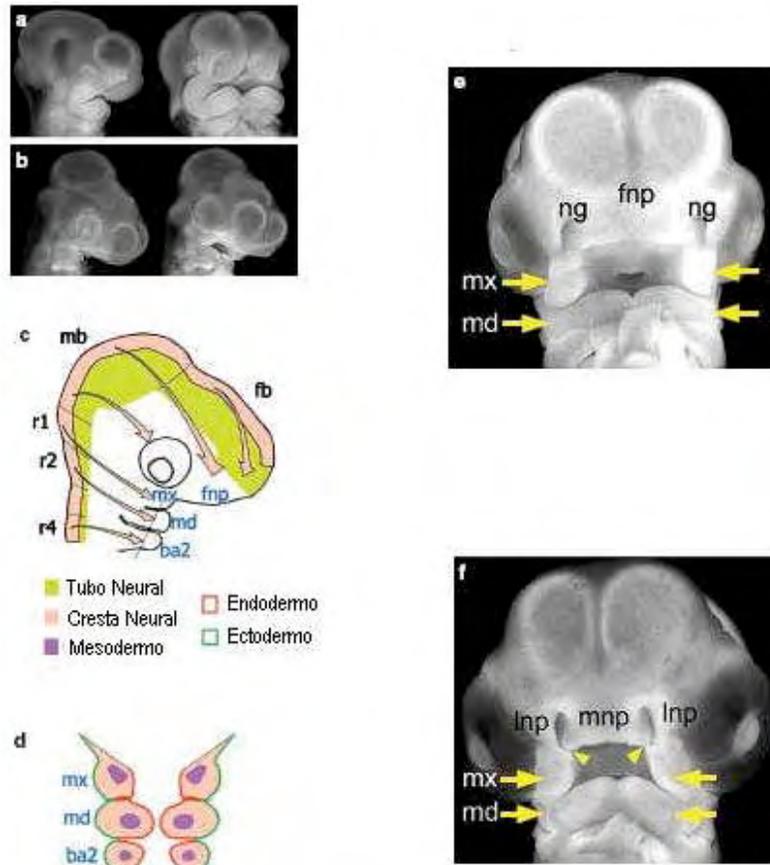


FIGURA 2. Se muestra la serie de eventos morfológicos, conservados evolutivamente que participan en el desarrollo facial. Las Fig. 2a y 2b comparan diferentes etapas del desarrollo facial en embriones de ratón y pollo respectivamente. La apariencia y crecimiento de los arcos branquiales se encuentra determinada por el mesénquima craneal derivado de la cresta neural (ectomesénquima), altamente proliferativo, con capacidad migratoria. Las flechas de la Fig. 2c indican la migración que siguen las células de la cresta hacia la cara en desarrollo. Fig. 2d El ectomesénquima rodea un núcleo de mesénquima. Las invaginaciones bilaterales dentro del proceso frontonasal (Fig. 2e) generan los procesos nasales lateral y medial, los cuales se unirán a los procesos maxilares (Fig. 2f, cabeza de flechas) para formar las aperturas nasales, el labio superior, la mandíbula y el paladar primario. Ba2: Arco branquial 2; fb: cerebro anterior; fnp: proceso frontonasal; lnp: proceso nasal lateral; mb: cerebro medial; md: proceso mandibular; mnp: proceso nasal medial; mx: proceso maxilar; ng: surcos nasales invaginando; r1-r4: rombomeros 1-4. (Modificado de McInnes, R. & Michaud, J. 2004)

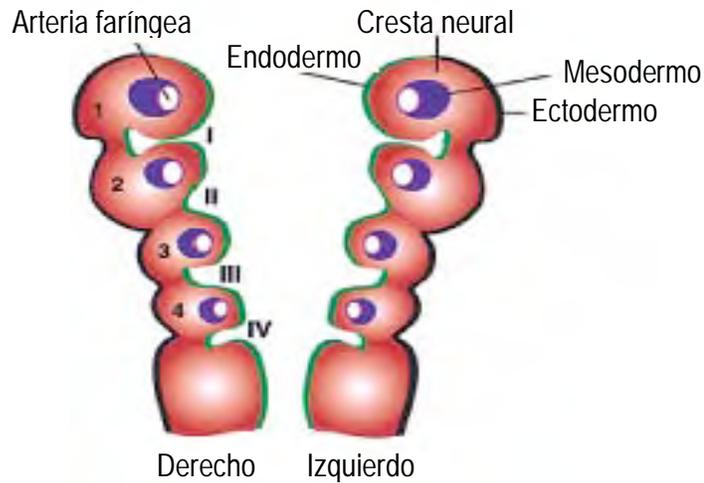


FIGURA 3. Corte coronal de los arcos faríngeos correspondiente a los días 9.5-10.5 de un embrión de ratón. Se demuestra el epitelio ectodérmico externo (negro), un núcleo central de mesodermo paraxial (azul) y un epitelio endodérmico interno (verde) el cual forma las bolsas faríngeas entre cada arco y las células de la cresta neural (rojo). Los números arábigos representan los arcos faríngeos 1° a 4° y los números romanos representan las bolsas faríngeas 1ª a 4ª. (Modificada de Yamagishi, H. 2002)



FIGURA 4. En esta imagen lateral de un embrión de ratón del día 9.5 de gestación equivalente a 28 días en un embrión humano, se aprecia el desarrollo de las estructuras de los arcos faríngeos. Las flechas muestran la migración de las células de la cresta neural cefálica derivadas del pliegue neural (dorso del tubo neural) hacia la cabeza, los arcos faríngeos y la región conotruncal del corazón. Los números arábigos representan los arcos faríngeos. (Modificada de Yamagishi, H. 2002)

Defectos en el 1º y 2º arco faríngeo dan origen a anomalías faciales menores y paladar hendido; defectos de las bolsas faríngeas 3ª y 4ª ocasionan hipoplasia del timo y glándula paratiroides y los defectos en la 3ª y 4ª arteria de los arcos dan lugar a anomalías aórticas y de la región conotruncal, ocasionando defectos cardiacos congénitos como la tetralogía de Fallot (TF) y el tronco arterioso persistente.

Estudios en embriones de pollo en los cuales se han inhibido a las células de la cresta neural antes de su migración del pliegue neural han originado en el embrión un fenotipo con las características principales de la del22q11.2. También mutaciones en genes implicados en el desarrollo de dichas células como *Pax3* o *endotelina-1* pueden inducir malformaciones similares a las producidas por la microdelección. (Scambler P, 2000)

I.3.- EMBRIOLOGÍA DEL CORAZÓN Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE LOS ARCOS FARÍNGEOS

El desarrollo cardiovascular en los seres humanos ocurre entre la 3ª y 8ª semana de gestación (sdg). El corazón tubular inicial comienza su desarrollo a mitad de la 3ª sdg, sin embargo la primera manifestación de este órgano inicia en la 2ª sdg con la aparición del campo del desarrollo cardiaco, el cual es la región del mesodermo que contiene las células cardiacas progenitoras y que se localiza lateralmente a la línea primitiva en la región caudal. (Fishmann M, 1997) Estas células se invaginan a través de la línea primitiva y migran rostrolateralmente (día 15 a 16 de gestación) hasta formar parte de la placa lateral en forma de herradura en el mesodermo (día 18 de gestación) que formará el tejido miocárdico auricular y ventricular. La diferenciación cardiaca se inicia en respuesta a la señal inductiva del mesodermo anterior. (Waldo K, 2001)

Estas células son capaces de diferenciarse en los tejidos integradores del corazón, se agregan los angioblastos desarrollando los cordones angioblásticos que forman al par de tubos endocárdicos laterales, los cuales a su vez son llevados juntos, por plegamiento, durante el principio de la 4ª sdg y se fusionan en dirección céfalo caudal, formando un tubo

cardíaco primitivo único (día 22). (Moore K, 1979) Entre las 5ª y 8ª sdg el corazón primitivo sufre un proceso de plegamiento y remodelación, iniciando el flujo sanguíneo y el proceso de eyección cardíaco. (Carlson C, 1997)

Durante el plegamiento cardíaco parte del epitelio endocárdico sufre una transformación de epitelio a mesénquima. Estas células mesenquimatosas migran hacia los cojinetes endocárdicos, los cuales se denominan de acuerdo a la región en la cual se desarrollan como cojinetes del tracto de salida y cojinetes atrioventriculares.

La formación del septum atrial y ventricular con la separación de los tractos de entrada y salida del corazón forman las cuatro diferentes cámaras cardíacas. Las estructuras definitivas que separan las cavidades atriales y ventriculares están formadas completamente por tejido muscular. Una pequeña parte del septum está formada por la fusión de los cojinetes atrioventriculares en la parte del extremo proximal del septum ventricular y es llamada septum membranoso. (Moore K, 1979; Carlson C, 1997)

La luz del tracto de salida común se separa en un tronco pulmonar y la aorta por la tabicación del tracto de salida. Este proceso involucra una población de células de la cresta neural cardíaca que contribuye al mesénquima condensado del septum aorticopulmonar. El control preciso de los procesos tales como la migración de las células de la cresta neural, diferenciación, proliferación, apoptosis y señalización intracelular son esenciales para la formación y moldeamiento correcto del corazón y el sistema vascular. Los cojines del tracto de salida son remodelados para formar las válvulas arteriales. Finalmente la aorta con sus válvulas aórticas, se continúan con el ventrículo izquierdo, y el tronco pulmonar con sus válvulas pulmonares originan el ventrículo derecho. (Moore K, 1979; Carlson C, 1997)

Las células de la cresta neural que están destinadas a formar parte del corazón provienen de los arcos faríngeos 3º, 4º y 6º; y llegan a la región del tracto de salida, donde generan parte del septum conotruncal y aorto pulmonar. Alternativamente, las células de la cresta neural pueden afectar la maduración de las células miocárdicas. (Fishmann M, 1997; Hutson M, 2008)

El tabique interventricular muscular crece del vértice del ventrículo común hacia los cojinetes endocárdicos auriculoventriculares. Al inicio permanece permeable un agujero interventricular, el cual se cierra a través de los procesos de crecimiento del tabique interventricular y la contribución de la cresta troncoconal que divide el tracto de salida del corazón. Componente membranoso derivado del tejido conjuntivo de los cojinetes endocárdicos. (Carlson C, 1997) (Fig.5 y Fig.6)

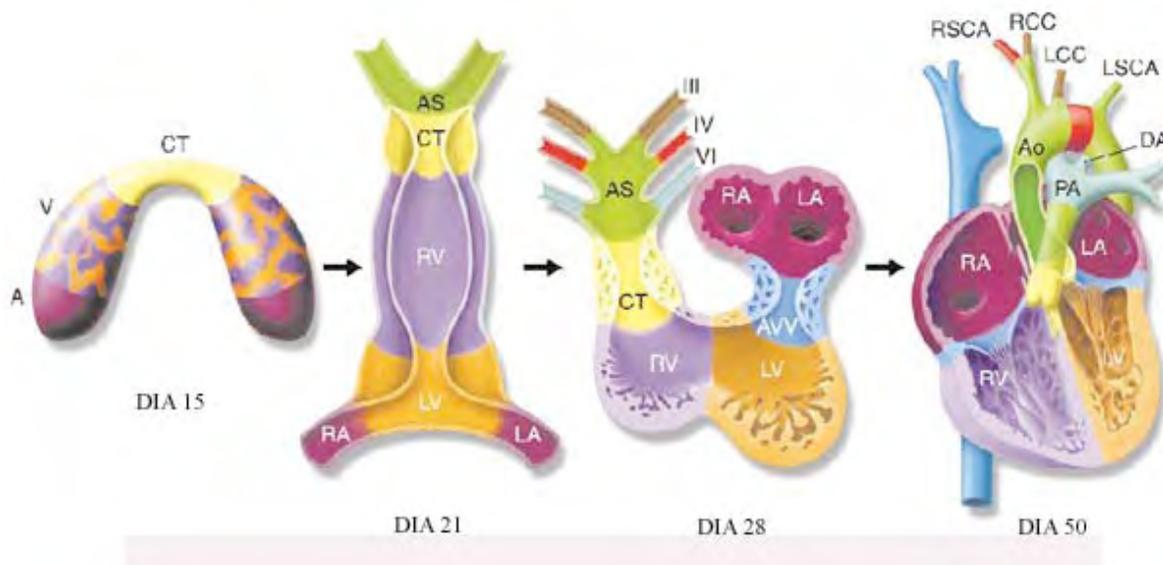


FIGURA 5. La imagen muestra el desarrollo cardíaco humano en corte ventral. Los precusores cardíacos (día 15) forman una media luna para formar segmentos específicos del tubo cardíaco lineal a lo largo del eje antero posterior que formará las cámaras del corazón. Las células mesenquimatosas forman las válvulas cardíacas de los segmentos conotruncal (CT) y válvula atrioventricular (AVV) A= atrio; Ao= Aorta; DA= Ducto Arterioso; LA= Aurícula Izquierda; LCC= Carótida Izquierda Común; LSCA= Arteria Subclavia Izquierda; LV= Ventrículo Izquierdo; PA= Arteria Pulmonar; RA= Aurícula Derecha; RCC= Carótida Derecha Común; RSCA= Arteria Subclavia Derecha; RV= Ventrículo Derecho; V= Ventrículo. (Modificada de Srivastava, D. & Olson, E. 2000)

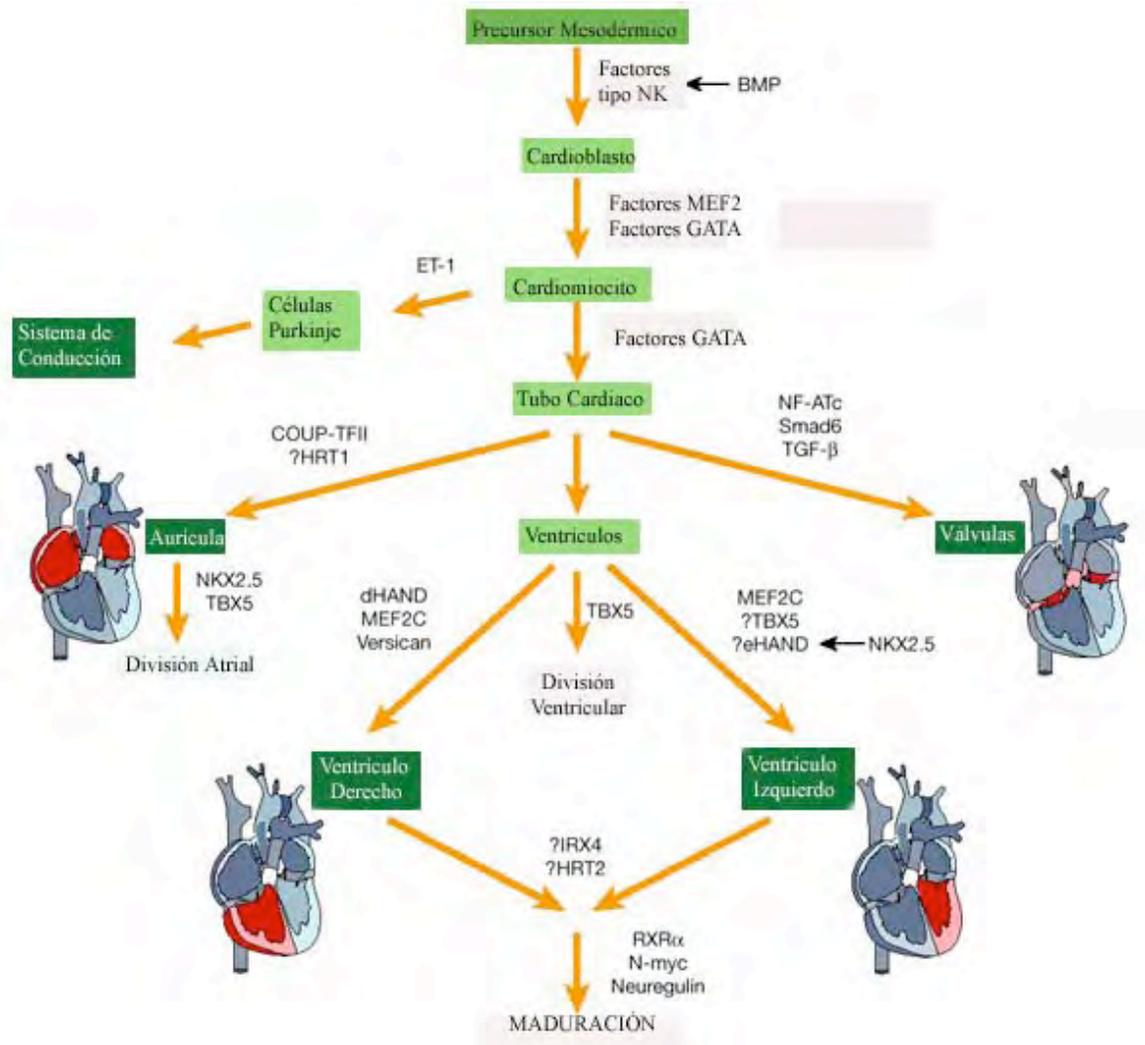


FIGURA 6. La imagen muestra los pasos en la morfogénesis cardíaca enfatizando los derivados mesodérmicos. La formación de válvulas, ventrículos, atrios y sistema de conducción se encuentran bajo el control de grupos de proteínas reguladoras independientes o bien parte de una vía común. Las cajas en verde oscuro señalan las regiones cardíacas afectadas por vías específicas. Los factores necesarios para los distintos pasos durante la cardiogénesis se muestran al lado de las flechas amarillas, mientras que factores de regulación con actividad no definida se señalan con interrogación. (Modificada de Srivastava, D. & Olson, E. A. 2000)

La TF representa el 10% de todas las cardiopatías congénitas y se clasifica dentro de las cardiopatías congénitas cianógenas. Anatómicamente consiste en cuatro alteraciones básicas: 1.- Estenosis de la válvula pulmonar; 2.- Comunicación interventricular; 3.- Cabalgamiento de la aorta; 4.- Hipertrofia ventricular derecha. Embriológicamente la alteración se debe a un desarrollo anormal de la región tronco-conal primitiva.. (Gámez J, 2000)

Como se ha descrito en párrafos anteriores y dado que la del22q11.2 afecta a estructuras originadas de las células de la cresta neural así como de los arcos faríngeos, se deriva la consideración de que por ende alteraciones a este nivel darán origen tanto a anomalías craneofaciales como cardíacas.

II.- ANTECEDENTES

II.1.- MICRODELECIÓN 22q11.1

II.1.1.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En 1955 la Dra. Eva Sedlacková describió a 26 pacientes que presentaban paladar blando corto y un paladar duro largo pero sin hendidura palatina (Turnpenny P, 2001), 10 años después el Dr. Angello DiGeorge describió a un paciente quien presentaba hipoparatiroidismo e infecciones recurrentes así como a 3 casos con agenesia del timo y de las glándulas paratiroides.

El fenotipo descrito por DiGeorge que hoy lleva su nombre resulta de un desarrollo anormal de los derivados de la 3ª y 4ª bolsa faríngea y comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas, siendo las principales: las cardiopatías congénitas (CC) especialmente las de tipo conotruncal; el dismorfismo facial, el hipoparatiroidismo y la agenesia o hipoplasia de timo y glándulas paratiroides.

Dentro de las principales dismorfias faciales que presenta el síndrome de DiGeorge (SDG) (OMIM #188400) se encuentra el hipertelorismo, labio y/o paladar hendido, úvula bífida, pabellones auriculares pequeños y de implantación baja. (Wilson D, 1993; Driscoll D, 1993; Dallapiccola B, 1996) (Fig.7)



FIGURA 7. Paciente con síndrome Velocardiofacial. Nótese la raíz nasal ancha, telecanto, epicanto y punta nasal bulbosa. (Tomada de Korf B, 2006)

En 1976 se describió un síndrome con apariencia facial distintiva caracterizada por cara alargada, telecanto, puente nasal ancho y dismorfia de pabellones auriculares, voz hipernasal y CC, al cual se le denominó síndrome “con *fascies* de anomalía conotruncal” (SFAC) o CAFS por sus siglas en inglés. (Yamagishi H, 2002) Dos años más tarde, el Dr. Shprintzen describió un cuadro clínico similar al presentado por DiGeorge, el cual posteriormente se denominaría síndrome de Shprintzen o síndrome Velocardiofacial (SVCF) (OMIM #192430), que presenta una *fascies* distintiva caracterizada por hipertelorismo, fisuras palpebrales cortas y estrechas, nariz prominente, raíz nasal ancha, boca pequeña con paladar hendido, retrognatia y dismorfia de pabellones auriculares. El paladar hendido condiciona una voz nasal, además se presentan anomalías cardíacas, hipoplasia o agenesia de timo e hipocalcemia y dificultad para el aprendizaje. (Dallapiccola B, 1996, Goldmuntz E, 1997, Matsuoka R, 1998; Henwood J, 2001; Heather E, 2002; Yamagishi H, 2002)

Es interesante notar que en la historia de los síndromes presentados, si bien se encontraban las descripciones clásicas con manifestaciones clínicas semejantes fue hasta 1993 en que se describe un posible origen compartido. Considerando lo anterior el SVCF es un padecimiento con herencia autosómica dominante asociado a la delección intersticial de un segmento del brazo largo del cromosoma 22 que comprende la región 1 banda 1 subbanda 2 (la del22q11.2). (Driscoll D, 1993)

Ya que el SDG, el SVCF y el SFAC se sobrelapan fenotípicamente y en todos ellos se ha reportado la presencia de la del22q11.2, en 1993 se propuso para englobar estos 3 síndromes, el acrónimo en inglés de CATCH22 por Defectos Cardíacos, *fascies* Anormal, hipoplasia de Timo, paladar hendido (Cleft), Hipocalcemia y delecciones en 22q11, sin embargo la utilización de este término es inapropiada debido a las implicaciones psicológicas para los pacientes y sus padres, además que ahora se sabe que el síndrome de Opitz G/BBB (OMIM %145410) y el síndrome de Cayler (SC) (OMIM %125520) son también causados por la del22q11, por lo tanto el espectro clínico es mucho mayor que el descrito por el acrónimo CATCH22. (Yamagishi H, 2002)

Otras características que podrían presentar estos pacientes son el retraso mental que puede ser desde leve hasta severo, problemas en el aprendizaje, problemas de comportamiento y algunos reportes señalan una predisposición mayor en la edad adulta para desarrollar padecimientos psiquiátricos como lo es la esquizofrenia (30%) y el trastorno bipolar. (Matsuoka R, 1998, Eliez S, 2001; Heather E, 2002)

Dada la herencia autosómico dominante y la variabilidad de expresión algunos padres afectados presentan un fenotipo menos severo que sus hijos, generalmente asociado a problemas de aprendizaje y frecuencia menor de CC (Dallapiccola B, 1996; Kobrynski L, 2007), lo que explicaría una mayor supervivencia que en aquellos pacientes con expresión más severa, ya que la causa principal de morbi-mortalidad de esta entidad es la CC que afecta aproximadamente al 75% de los pacientes. (Scambler P, 2000)

La hemicigosidad de la región 22q11 también ha sido reportada en el síndrome de Kousseff y el síndrome de válvula pulmonar ausente. El solapamiento de las características clínicas en los pacientes con estos síndromes ha llevado a la propuesta de que representan parte de un amplio espectro clínico causado por la deleción de un segmento cromosómico que contiene genes sensibles a dosis y que son el resultado final de un misma etiopatogenia genética. (Tabla I) (Driscoll D, 1993; Dallapiccola B, 1996; Scambler P, 2000; Yagimeshi H, 2002)

TABLA I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS DISTINTOS SÍNDROMES QUE PRESENTAN LA del22q11.2

CARACTERÍSTICA CLÍNICA	SVCF	SDG	CATCH22	OPITZ G	CAYLER
Microcefalia	+	+	+	+	-
Parálisis facial unilateral	-	-	-	-	+
Asimetría facial al llanto	-	-	-	-	+
Defecto huesos faciales	-	-	-	-	+
Hipertelorismo	+	+	+	+	-
Telecanto	-	+	+	+	-
Fisuras palpebrales estrechas	+	+	+	-	-

CARACTERÍSTICA CLÍNICA	SVCF	SDG	CATCH22	OPITZ G	CAYLER
Continuación...					
Raíz nasal ancha	+	+	+	-	-
Nariz bulbosa / punta cuadrada	+	+	+	-	-
Filtrum corto	+	+	+	-	-
Labio hendido	-	-	-	+	-
Paladar hendido	+	+	+	+	-
Úvula hendida	-	-	-	+	-
Micrognatia	+	+	+	-	-
Retrognatia	+	+	+	-	-
Dismorfia pabellones auriculares	+	+	+	-	-
Llanto grueso	-	-	-	+	-
Fistula Laringo-Traqueo-esofágica	-	-	-	+	-
Cardiopatía	+	+	+	+	+
Hipospadias	+	+	+	+	+
Criptorquidea	-	-	-	+	+
Escroto bífido	-	-	-	+	+
Ano imperforado	-	-	-	+	+
Retraso mental	+	+	+	+	+
Anormalidades SNC	-	-	-	-	+
Anormalidades gastrointestinales	-	-	-	-	+
Hipocalcemia neonatal	-	+	+	-	-
Hipoplasia glándula tiroides	-	+	+	-	-
Deficiencia de células T	-	+	+	-	-
Habla hipernasal	+	+	+	+	-
Retraso en el lenguaje	+	+	+	+	-
Dificultades en aprendizaje	+	+	+	-	-
Desórdenes psiquiátricos	+	+	+	-	-
Talla baja	+	+	+	-	-
Vasos de retina tortuosos	+	-	-	-	-
Discos ópticos pequeños	+	+	+	-	-
Manos pequeñas	+	+	+	-	-
Insuficiencia velofaríngea	+	+	+	+	+

II.1.2.- CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

Además de los síndromes anteriormente descritos, la la del22q11.2 se asocia a un gran número de CC aisladas dentro de las cuales predominan los defectos de tipo conotruncal. Las CC ocurren en 75 de cada 1000 RNV en sus formas leves (Sánchez R et al, 2006), mientras que se presentan con una frecuencia de 8 de cada 1000 RNV aproximadamente en las formas moderadas a severas y son consideradas una de las malformaciones congénitas más comunes.

La mayoría de las CC del corazón ocurren de forma aislada y estos representan la tercera causa de muerte en niños de 1 año de edad y la sexta en niños de 3 años de edad. En la mayor parte de los casos la herencia es de tipo multifactorial existiendo un riesgo aumentado de recurrencia en aquellas familias en las cuales hay un hijo afectado y un riesgo mayor si la madre es la afectada. Esto sugiere que hay una predisposición a las malformaciones cardíacas influenciada por el ambiente y los antecedentes genéticos. (Goldmuntz E, 1993; Stevenson R, 1993; Hoffman J, 2002, Sánchez R, 2006)

La etiología de las CC es heterogénea ya que se han reconocido tanto patrones de herencia monogénicos (5% de los casos), alteraciones cromosómicas (13%), como herencia multifactorial. (Sánchez et al 2006). De todas las CC los defectos del tabique ventricular constituyen 25% y tienen una incidencia estimada de 1 en 800 RNV cuando se encuentra como defecto aislado. (Stevenson R, 1993)

Dentro de las cardiopatías congénitas aisladas más frecuentes la interrupción del arco aórtico, principalmente la interrupción aórtica tipo B y sus ramas con un corazón estructuralmente sano se han asociado a la delección 22q11.2 en aproximadamente 9% de los casos. (Momma K, 1999) y 19% (Botto L, 2003)

Por otra parte, la TF se asocia de 6 a 20% (Momma K, 1999) y hasta 35% (Botto L, 2003) con la presencia de la del22q11.2. Se ha reportado una mayor incidencia de las anomalías

del arco aórtico y sus ramas en la TF con la delección que en aquellos pacientes que no la presentan. (Momma K, 1999)

Se estima que aproximadamente 50% de los pacientes que cursan con interrupción del arco aórtico tipo B presentarán la del22q11.2. La incidencia de la delección es alta en la TF, la ausencia de válvula pulmonar y conducto arterioso reportándose hasta en un 75% de los casos. (Momma K, 1999)

Alrededor de 30% de los pacientes que presentan la del22q11.2 cursan con TF acompañada de atresia pulmonar o bien algún defecto del septum ventricular y atresia pulmonar. Los defectos ventriculares septales con o sin anomalía del arco aórtico son la segunda cardiopatía congénita más frecuente seguida por la TF. (Momma K, 1999)

En conclusión, alrededor de 5% de los niños que nacen con algún defecto cardiaco congénito aislado presentan la delección 22q11.2 y 81% de los pacientes con la del22q11.2 presentan defecto cardiaco, el cual es la anomalía estructural más consistente con el síndrome, acompañado por las dismorfias faciales, la dificultad para el aprendizaje y la insuficiencia velofaríngea.

Las anomalías cardiacas más comunes en pacientes con la del22q11.2 son los defectos conotruncales de 8-17% a 63 % de los casos (Hofbeck M, 1999; Botto L, 2003), incluyendo la interrupción del arco aórtico tipo B, tronco arterioso, TF y sus variantes y transposición de grandes vasos. (Henwood J, 2001; Heather E, 2002; Botto L, 2003) (Tabla II)

TABLA II. CARDIOPATÍAS ASOCIADAS A LA del22q11.2

CARDIOPATÍA	PORCENTAJE
TF y sus variantes	35 %
1. Atresia pulmonar + DSV	14 %
2. TF + ausencia válvula pulmonar	7 %
3. TF simple	14 %
Interrupción arco aórtico	19 %
Defecto Septal Ventricular (DSV)	16 %
Tronco arterioso	9 %
Anormalidades Vasculares	51 %
1. Arco aórtico derecho	35 %
2. Origen aberrante de la arteria subclavia	16 %
3. Vasos braquiocefálicos en espejo	12 %
Anillo vascular	5 %

* Tabla modificada de Botto L et al, 2003.

II.1.3.- INCIDENCIA

La incidencia de la del22q11.2 es variable según las poblaciones estudiadas y el tamaño de la muestra así como de si se trata del reporte del espectro o de entidades sindrómicas específicas. En Suecia se ha reportado una incidencia anual de 1 en 7000 RNV con una prevalencia en menores de 16 años de 1 en 7500, sin embargo específicamente en la ciudad de Gothenburg la incidencia es de 1 en 5900 RNV. En la región flamenca de Bélgica se ha reportado una prevalencia de 1 en 6395 de acuerdo a un estudio realizado de 1992 a 1996, por otra parte en el sur de Francia se reporta una prevalencia de 1 en 9700. La

prevalencia es similar en los diferentes grupos étnicos, sin embargo se reporta una prevalencia mayor en hispánicos de hasta 1 en 3800 RNV. (Botto L, 2003; Óskarsdóttir S, 2004, Kobrynski L, 2007)

La mayoría de los casos (80-90%) de SVCF son esporádicos sin embargo en 10 al 20% se ha descrito una herencia autosómica dominante asociada a la del22q11.2. (Driscoll D, 1993; Dallapiccola B, 1996; Carlson C, 1997; Henwood J, 2001; Yamagishi H, 2002; Kapadia R, 2008). En 1997 Momma et al estudiaron a 15 pacientes japoneses con tronco arterioso común y en 5 de ellos encontraron la del22q11.2, al ser revisados intencionalmente, estos 5 pacientes presentaban *fascies* de anomalía conotruncal. (Momma K, 1997)

Cerca de 30% de los pacientes con tronco arterioso persistente tienen SDG y la del22q11.2 asociada. La del22q11 y el SDG siempre se acompañan de una *fascies* anormal. La asociación de del22q11 con la presencia de tronco arterioso se debe sospechar en presencia de hipocalcemia, *fascies* peculiar, paladar hendido e hipoplasia de timo y se confirma mediante FISH. (Momma K, 1997)

En 1998 Goldmuntz et al realizaron un estudio en 251 pacientes con diagnóstico de CC conotruncal (7 tipos distintos) a quienes se les realizó FISH, encontrándose que 17.9% de estos pacientes presentaban la del22q11.2, con lo que determinaron que ésta es una causa importante en la etiología de las CC conotruncuales. (Goldmuntz E, 1998)

La frecuencia de la del22q11.2 varió con los diagnósticos primarios encontrando que fue más frecuente en los pacientes con interrupción del arco aórtico (50%) y en persistencia del tronco arterioso (34.5%). En este estudio 15.9% de los pacientes con TF tuvieron del22q11 consistente con lo reportado en la literatura previamente (Goldmuntz E, 1993; Momma K, 1997; Yamagishi H, 2002). La presencia de la del22q11 fue tan frecuente en los pacientes con TF y atresia pulmonar como en aquellos con TF y estenosis o ausencia de la válvula pulmonar, en contraste con otros estudios en los cuales se reporta una mayor incidencia de la del22q11 en pacientes con TF y ausencia de la válvula pulmonar. (Goldmuntz E, 1998)

II.1.4.- BASES MOLECULARES

Los primeros datos sobre la posible causa del síndrome de del22q11 fueron reportados cuando Chapelle publicó una familia con la translocación cromosómica $t(20;22)(q11;q11)$ en donde 5 pacientes presentaban SVCF. (Wilson D, 1993) y se asoció a una deleción intersticial de aproximadamente 1.5 a 3 Mb en 22q11.2. El noventa por ciento de los pacientes con SVCF tienen los mismos puntos de ruptura proximales y distales sin embargo una minoría tienen un punto de ruptura distal distinto, lo que origina una deleción de 1.5Mb aproximadamente. (Carlson C, 1997; Goldmuntz E, 1997; Henwood, J 2001) (Fig.8)

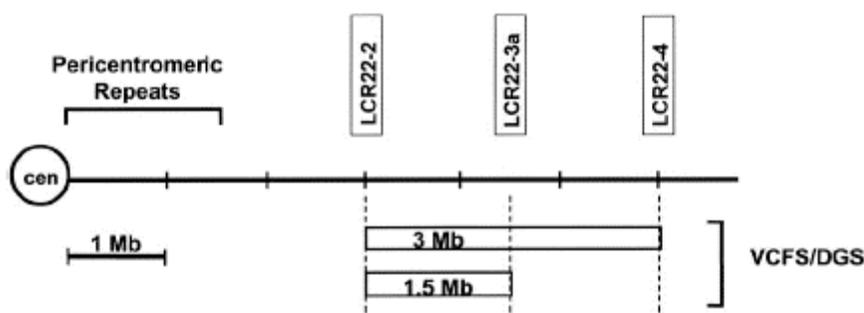


FIGURA 8. En esta imagen ilustra los LCRs implicados en la del22q11.2 tanto en la deleción típica de 3 Mb como en la de 1.5 Mb. Los puntos de ruptura proximales ocurren en el LCR22-2, el punto de ruptura distal para la deleción de 1.5 Mb ocurre en el LCR22-3^a y para la deleción de 3 Mb ocurre en LCR22-4. (Modificado de McDermid H.E & Morrow B. 2002)

Algunos autores describen que casi 100% de los pacientes con SVCF presentan la deleción siendo que en 90% de ellos es de 3Mb y en 7% es de 1.5Mb, desde 1993 se sabe que ambas son resultado de eventos de recombinación homóloga no alélica. (Goldmuntz E, 1997, Ben-Shachar S, 2008)

En 1999 Edelman et al analizaron los haplotipos en dos familias diferentes con tres generaciones afectadas por SVCF y además de demostrar la presencia de la del22q11.2 encontraron que en dos casos esporádicos existió una recombinación homóloga intracromosómica la cual fue la responsable de la delección de 3Mb descrita en estos dos casos. (Edelman L, 1999) (Fig.9)

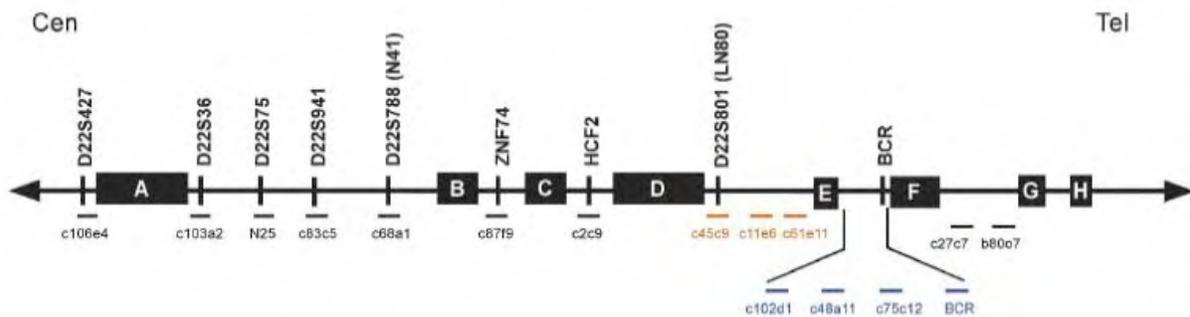


FIGURA 9. En esta imagen se muestra la distribución de los 8 LCRs en la región 22q11.2, estos se representan como cuadros negros marcados de la A a la H. Modificada de Shaikh Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: Sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res.* 17:482-491, 2007.

Dentro de la región 22q11 hay un total de 8 LCRs, los 4 LCRs proximales han sido ampliamente caracterizados debido a su participación en rearrreglos cromosómicos de 22q11 que llevan a la presentación del SDG/SVCF y Síndrome Cat Eye (SCE) por delección y duplicación de la región respectivamente. Estos 4 LCRs se denominan LCR-A al LCR-D de acuerdo a su localización cromosómica siendo LCR-A el más proximal al centrómero.

Los LCRs proximales son más extensos que los distales y tienen una estructura modular compleja. De ellos el LCR-A y el LCR-D son a su vez los más extensos y los más complejos en cuanto a su organización y median la delección común de 3Mb del SDG/SVCF. El grado de semejanza mayor de 98% entre las secuencias de los módulos ha impedido que se logre la caracterización final a nivel de secuencia de nucleótidos de los puntos de ruptura más comunes de la delección.

Los 4 LCRs distales, LCR-E a LCR-H, son más pequeños con menos módulos duplicados. Este agrupamiento de LCRs raramente ha sido asociado a deleciones distales de 22q11, posiblemente debido a su menor tamaño y a su mayor grado de variación en la secuencia. (Shaikh T, 2007)

La haploinsuficiencia de algunos de los genes que se encuentran en la región 22q11.2 es responsable del cuadro clínico característico, por ejemplo la haploinsuficiencia de *TBX1* lleva a la formación de estructuras embrionarias faciales más pequeñas debido a una disminución en la proliferación de las células del endodermo de los arcos branquiales. Una cascada de factores de transcripción regulan el desarrollo de la glándula paratiroides y el timo, *TBX1* activa directamente al factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8), FGF10, al factor miogénico 5 (MYF5) y al factor de diferenciación miogénica 1 (MYOD1). (Kobrynski L, 2007)

Los FGF8 y FGF10 promueven el crecimiento de las células que se encuentran a su alrededor y participan en la migración de las células de la cresta neural, mientras que MYF5 Y MYOD1 regulan el desarrollo de los músculos branquiales. Un desarrollo anormal de estos músculos podría explicar las dificultades para tragar y los problemas de alimentación de la infancia en los pacientes con SVCF.

TBX1 también se expresa en el campo cardiaco secundario el cual da origen a las estructuras del tracto de salida, al ventrículo derecho y al mesénquima del cerebro. Las células de este campo son derivadas del mesodermo faríngeo. Algunos estudios han demostrado la expresión de este gen en un grupo pequeño de células del campo cardiaco anterior que se convertirán en cardiomiocitos en el tracto de salida. Estas células marcan el camino para la migración subsecuente de las células de la cresta neural y son importantes para la formación de estructuras cardiacas. (Kobrynski L, 2007)

II.1.5.- GENES CANDIDATOS

Además del mencionado *TBX1*, existen más de 30 genes descritos en la región de la del22q11.2, si bien *TBX1* es el único que se ha encontrado mutado en algunos pacientes con un fenotipo similar a aquellos pacientes que presentan la deleción completa lo que sugiere que la haploinsuficiencia *per se* de este gen sea la causante principal del fenotipo de los pacientes con SVCF y también se considera el gen principal para el fenotipo cardiaco. (Baldini A, 2006) Estudios realizados en mamíferos han demostrado su importancia en el desarrollo cardiaco ya que al ser mutado en ratones knockout ha alterado la formación del 4° arco arterial branquial, precursor del ventrículo derecho y del tracto de salida. (Kobrynski L et al, 2007) *TBX1* se expresa preferencialmente en el núcleo mesodérmico adyacente a las arterias de los arcos faríngeos, en el epitelio endodérmico de los arcos faríngeos, en la mitad ventral de las vesículas óticas y en el mesénquima de la cabeza. (Yamagishi H, 2002) (Fig.10)

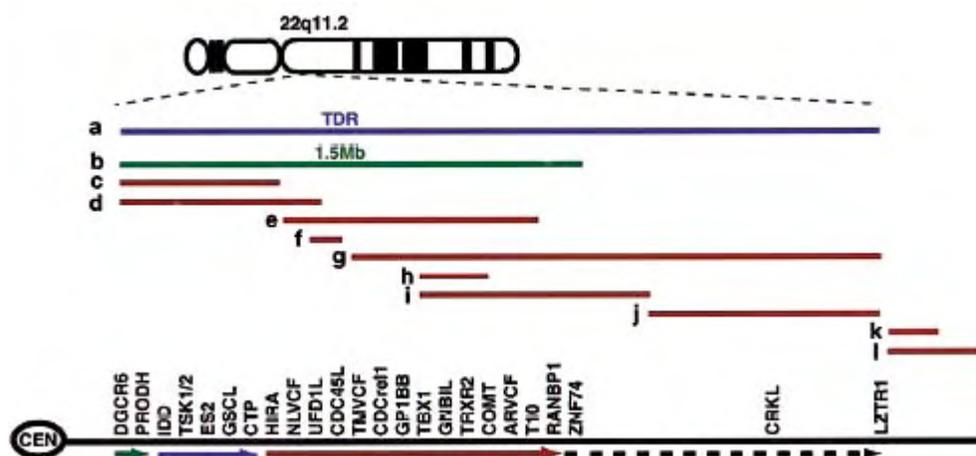


FIGURA 10. Imagen que representa los genes (línea inferior) y las deleciones en la región 22q11.2. La línea **a** señala la deleción de 3 Mb; la línea **b** señala la deleción de 1.5 Mb; la línea **c** muestra deleciones atípicas que se han reportado en 10 individuos. Cen: centrómero. (Modificada de Yamagishi, H., 2002)

TBX1 es un miembro de la familia de genes que codifican a factores de transcripción de T-box. En modelos animales en ratón se ha demostrado que los hemicigotos para *Tbx1* presentan defectos cardiacos moderados sin viabilidad reducida, sin embargo la alteración en ambas copias de *Tbx1* mostraron una letalidad perinatal con aplasia de timo y glándula paratiroides así como malformaciones de pabellón auricular, paladar hendido, tronco arterioso o defectos cardiacos conotruncales más severos que aquellos que se presentaron en modelos con hemicigosidad, demostrando el importante papel del gen en el desarrollo normal de estas estructuras y supervivencia del embrión.

Otros genes candidatos que se encuentran dentro de la región la del22q11.2 humana son *HIRA*, *UFDIL*, *COMT*, *PRDH*, *CRKL* y *GSCL*, sin embargo ninguna alteración en estos genes ha mostrado un fenotipo relevante así como tampoco se encuentran expresados en ninguno de los precursores de las estructuras afectadas, por lo que a la fecha no se pueden considerar genes candidatos principales. (Heather E, 2002)

El gen *CRKL*, miembro de la familia de protein-tirosin cinasas con dominios SH2 y SH3 es otro candidato codifica para una proteína adaptadora SH2-SH3-SH3 involucrada en la respuesta del factor de crecimiento y en la señalización de adhesión focal y se encuentra expresado en células de la cresta neural durante la embriogénesis. La ausencia de ambas dosis de *CRKL* en ratones es letal en periodo embrionario y estos desarrollan un fenotipo similar al de la del22q11.2. Los ratones heterocigotos no muestran alteración fenotípica lo que sugiere que este gen no es haploinsuficiente. (Heather E, 2002; Yamagishi H, 2002)

UFDIL se ubica corriente abajo de *dHAND* este último gen se encuentra involucrado en el control del desarrollo de las estructuras afectadas en el SDG. *UFDIL* se expresa en los arcos branquiales, proceso frontonasal, tracto de salida y extremidades y está implicado en la degradación proteica mediada por ubiquitina. La atenuación de *ufdil* en células de la cresta neural cardiacas en embriones de pollo resultaron en un incremento en la incidencia de falla septal del tracto de salida cardiaco. (Wadey R, 1999; Yamagishi H, 2002)

HIRA codifica para proteínas histona dependientes represoras de la regulación del ciclo celular y se expresa en todos los tejidos derivados de la cresta neural. Atenuación en la

expresión de *HIRA* en células de la cresta neural cardiaca de pollo mostraron un incremento en la incidencia de persistencia de conducto arterioso. *HIRA* interactúa bioquímicamente con Pax3, una proteína implicada en el desarrollo de la cresta neural. (Yamagishi H, 2002)

COMT codifica para catecol-O-Metiltransferasa y *PRODH* codifica para prolina deshidrogenasa, ambos han sido relacionados con el fenotipo psiquiátrico y las alteraciones del comportamiento de los pacientes con la del22q11.2. Los ratones con *comt* mutado desarrollan un comportamiento emocional alterado y aquellos con *Prodh* mutado presentan un déficit sensorimotor que en condiciones normales permite que la atención se centre en un solo estímulo, situación contraria a lo observado en ciertos pacientes psiquiátricos. (Yamagishi H, 2002)

RanBP1, también conocido como *Htf9a*, es otro gen candidato. *RanBP1* es un compañero de unión de la proteína nuclear Ran/TC4. Este gen se expresa en la región frontonasal, arcos branquiales, extremidades y corazón, sitios en donde se encuentran concentradas células mesenquimatosas derivadas de la cresta neural. (Maynard T et al, 2001)

En el presente trabajo se analizará la experiencia del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) en el diagnóstico por FISH de la del22q11.2 en aquellos pacientes con diagnóstico clínico de SVCF o CC del tipo TF. Así mismo se intenta establecer la correlación fenotipo-genotipo en estos pacientes y saber la incidencia de la del22q11.2 en pacientes que acuden a nuestra Institución.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia de la del22q11.2 en pacientes del HIMFG que se encuentran en estudio por CC aislada conotruncal de tipo TF o por SVCF en los que se solicitó estudio citogenético por FISH para la del22q11.2 en un periodo comprendido de diciembre de 2005 a mayo de 2008?

IV.- JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la literatura mundial el síndrome de del22q11 se encuentra entre los síndromes genéticos por microdelección más comunes. En México si bien varios grupos clínicos realizan la determinación de la del22q11.2 por FISH, no se ha publicado la frecuencia de este síndrome en nuestro país, así como tampoco se ha realizado una correlación genotipo fenotipo en estos pacientes. Identificar nuestra frecuencia nos permitirá por una parte conocer y correlacionar el perfil clínico y citogenético de esta patología en población mexicana y además ofrecer un mejor asesoramiento genético a los pacientes. al confirmar o descartar por citogenética molecular la presencia o ausencia de la delección además de analizar las características fenotípicas que los pacientes presentan.

V.- OBJETIVO GENERAL

Conocer la frecuencia de la del22q11.2 y el fenotipo asociado en la población de pacientes que acudieron al HIMFG con diagnóstico clínico de TF o SVCF entre diciembre de 2005 y mayo de 2008

V.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Establecer la correlación entre el fenotipo y la presencia o ausencia de la del22q11.2 en los pacientes estudiados.
- 2.- Identificar la frecuencia de la presencia de la del22q11.2 en pacientes con TF aislada
- 3.- Identificar la frecuencia de la presencia de la del22q11.2 en pacientes con SVCF

VI.- VARIABLES

VI.1.- VARIABLES INDEPENDIENTES

- 1.- Fenotipo de los pacientes
- 2.- Tipo de cardiopatía

VI.2.- VARIABLES DEPENDIENTES

- 1.- Presencia o ausencia de la del22q11.2

VII.- TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, observacional, transversal y ambilectivo.

VIII.- MATERIAL Y METODOS

La presente tesis fue desarrollada en el Departamento de Genética del HIMFG tanto en el área clínica como en los laboratorios de Citogenética y Biología Molecular y constituye parte del protocolo de investigación "Búsqueda y caracterización de mutaciones en el gen *NKX2.5* en pacientes mexicanos con TF o síndrome de heterotaxia visceral" HIM/2005/016 en colaboración con el Departamento de Cardiología, se solicitó consentimiento informado. Además se incluyó a los pacientes que acudieron a la Consulta Externa de Genética con diagnóstico clínico de SVCF para quienes se solicitó descartar del22q11.2 y aceptaron realizarse el estudio, lo anterior en el periodo comprendido de diciembre de 2005 a mayo de 2008.

Se realizó historia clínica genética y se revisaron los expedientes de los pacientes, se realizó valoración clínica para establecer el diagnóstico en su caso de SVCF, TF, SDG u otros y que cumplieren con los criterios de inclusión. Se tomó muestra de sangre periférica para estudio con técnica convencional de bandas GTG para descartar alteración cromosómica de tipo numérico o estructural, posteriormente se llevó a cabo el estudio de FISH con la sonda TUPLE1 (Vysis ®) que detecta la delección.

VIII.1.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

VIII.1.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes en edad pediátrica desde RN a 17 años que aceptaran participar en el estudio y tuvieran uno de los siguientes diagnósticos:
 - Diagnóstico de CC aislada tipo TF
 - Diagnóstico clínico de SVCF

VIII.1.2.- CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Aquellos pacientes con diagnóstico de CC aislada tipo TF que no desearan participar en el estudio.
2. Pacientes con diagnóstico de CC aislada tipo TF o SVCF que hubieran sido transfundidos con sangre fresca total en los últimos 3 meses

VIII.1.3.- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Pacientes cuya muestra haya sido insuficiente para realizar los análisis por cariotipo y FISH y no se pudo obtener nueva muestra.

VIII.2.- MÉTODOS

VIII.2.1.- ANÁLISIS CLÍNICO

A todos los pacientes se les realizó evaluación clínica genética y cardiológica estudiándose las variables de género, lugar de procedencia, edad, alteraciones craneofaciales, oculares, nasales, pabellones auriculares y de extremidades así como alteraciones endocrinológicas y metabólicas específicamente del calcio y otras. (ver tablas de resultados)

VIII.2.2.- TÉCNICA DE FISH

La hibridación *in situ* fluorescente (**FISH** por sus siglas en inglés) es un método altamente sensible y específico de detección de secuencias de ácidos nucleicos. Generalmente la sonda que se utiliza para FISH es una secuencia genómica de la región de interés la cual se clona como inserto en un vector que hibrida a la región homóloga del par de cromosomas en estudio.

En la realización de la técnica de FISH se usan sondas de DNA marcadas con fluorescencia, ésta puede llevarse al cabo en células, núcleos o cromosomas de metafases que se obtengan tanto de cultivo como de biopsia que pueden provenir de especímenes frescos, refrigerados o fijados; las preparaciones se analizan en portaobjetos observadas en microscopio de epifluorescencia. (Nussbaum R, 2001)

El procedimiento básico para realizar la técnica de FISH se divide en 6 pasos:

1. Preparación de la laminilla
2. Preparación de la sonda
3. Hibridación
4. Lavado
5. Contra-tinción
6. Visualización

Se requiere del siguiente material para llevar a cabo la técnica:

- Formamida
- 20x SSC
- Sonda de locus específico: DiGeorge/VCFS espectro naranja*.
- Buffer para la sonda
- Etanol
- NP-40 1000 ul
- DAPI II

La sonda de doble color incluye dos secuencias únicas TUPLE1 (HIRA) espectro naranja, y del gen de arilsulfatasa A (ARSA) como control (espectro verde). La sonda LSI TUPLE 1 contiene los siguientes loci: región no codificadora 3' de TUPLE 1, D22S553, D22S609 y D22S942. Los 110 Kb de la sonda TUPLE1 no contiene los loci más teloméricos D22S941 y D22S943. La sonda de LSI ARSA sirve como control interno y se encuentra muy cerca del telomero 22 en 22q13. La sonda control define la orientación del cromosoma y provee un locus de diferente información en células de interfase y metafase. (Fig.11)

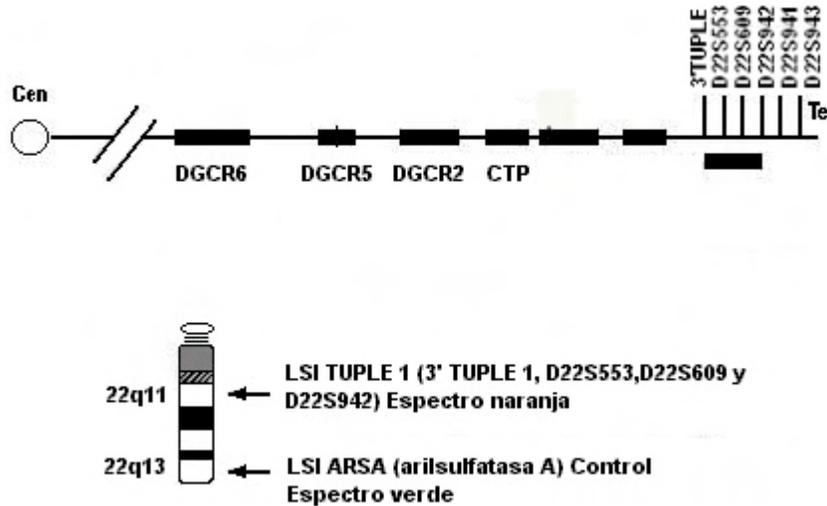


Figura 11. Ideograma del cromosoma 22 mostrando las regiones de hibridación de la sonda LSI TUPLE1 Vysis ® Catálogo Vysis 2005

Preparación de la laminilla.

Las células son tratadas para facilitar la ruptura de la membrana celular. Para la obtención de cromosomas en metafase o profase para la técnica de FISH se siguen los protocolos citogenéticos estándar de cultivo, cosecha y preparación de laminillas. Las laminillas se almacenan a -20°C por una semana, se revisa por contraste de fase para seleccionar un campo apropiado, se deshidratan en etanol al 70%, al 85% y al 100% por un minuto en cada concentración.

Desnaturalización.

Las sondas de DNA usadas para realizar la técnica de FISH contienen una marca que permite su detección después de la hibridación con el DNA blanco de interés. Las sondas son marcadas por dos vías de acuerdo al fabricante (manual de Vysis ®). El marcaje directo de la sonda es el más avanzado y simple, se adicionaron por cada área blanco en un tubo de microcentrífuga a temperatura ambiente los siguientes reactivos:

- ✓ 7 μl LSI de buffer de hibridación
- ✓ 0.5 μl de sonda.

- ✓ 2.5 µl H₂O purificada

Hibridación.

La mezcla total de 10 µl se adicionó al DNA blanco en la laminilla y posteriormente se selló el área de hibridación con un cubreobjetos y cemento LILI®. La laminilla preparada con la sonda y el DNA blanco fueron desnaturalizados térmicamente. A continuación se colocaron las laminillas en un aparato HYBRITE de Vysis ®. La reacción fue llevada a 37°C por 24 hrs.

Lavado.

El exceso de sonda fue eliminado con las siguientes soluciones:

- ✓ 70 ml de 0.4XSSC/0.3% NP-40 en un vaso de Coplin.
- ✓ 70 ml de 2XSSC/0.1% NP-40 en un vaso de Coplin.

Se pusieron a una temperatura de 73±1°C en baño María por 30 minutos. Después de remover el cubreobjetos de la laminilla se sumergieron inmediatamente en la solución de 0.4XSSC/0.3% NP-40, agitándose de 1-3 segundos y sacándolas después de dos minutos para después sumergirlas en la solución de 2XSSC/0.1% NP-40, se agitaron por 2 segundos y después de 1 minuto se sacaron permaneciendo a temperatura ambiente para su secado.

Contratinción.

Se aplicaron 10 µL de DAPI II para luego colocar un cubreobjetos.

Visualización.

Se hizo la observación de la laminilla en un microscopio de epifluorescencia Zeiss modelo Imager.A1 AX10. La responsable de la técnica de FISH fue la Dra. Rocío Sánchez Urbina.

IX.- RESULTADOS

En las libretas de consulta y por los protocolos de investigación que se llevan al cabo en el Departamento de Genética inicialmente se identificaron 85 pacientes en estudio por TF (30) o SVCF (55) diagnosticado clínicamente, se eliminaron 44 pacientes por estar pendiente completar estudio citogenético por lo que finalmente se incluyeron 41 pacientes, 17 de los cuales tienen diagnóstico de TF y 24 diagnóstico de SVCF. De los 24 pacientes con SVCF 41.7% (10) son hombres y 58.3% (14) son mujeres; mientras que 53% (9) de aquellos con TF son hombres y 47% (8) son mujeres. (Tabla III)

TABLA III. GENERO

GENERO	SVCF		TF	
HOMBRES	10	41.7%	9	53%
MUJERES	14	58.3%	8	47%
TOTAL	24		17	

Los lugares de procedencia más frecuentes fueron: Distrito Federal, Estado de México, Puebla e Hidalgo. (Tabla IV)

TABLA IV. PROCEDENCIA

PROCEDENCIA	SVCF (24)	TF (17)
Distrito Federal	33.3% (8)	23.5% (4)
Estado de México	29.2% (7)	41.2% (7)
Hidalgo	8.3% (2)	17.6% (3)
Michoacán	4.2% (1)	-
Puebla	12.5% (3)	-
Querétaro	8.3% (2)	-
San Luis Potosí	-	11.8% (2)
Veracruz	4.2% (1)	5.9% (1)

Los rangos de edad fueron de menos de 1 mes hasta 14 años, siendo el diagnóstico más frecuente a la edad de 5 años para el SVCF y de 1-4 y 7 años para TF. (Tabla V)

TABLA V. EDAD

EDAD	SVCF (24)		TF (17)	
Menos de 1 mes	1	4.2%	-	-
1 mes – 1 año	1	4.2%	-	-
1 a 4 años	7	29.1%	6	35.3%
5 años	7	29.1%	4	23.5%
6 años	-	-	1	5.9%
7 años	2	8.3%	4	23.5%
8 años	1	4.2%	1	5.9%
9 años	1	4.2%	1	5.9%
12 años	3	12.5%		
14 años	1	4.2%		

Se encontraron dismorfias faciales en todos los pacientes con SVCF (Fig.12) y al buscarse intencionadamente éstas se diagnosticaron también en 3 (29.4%) de los pacientes con TF.

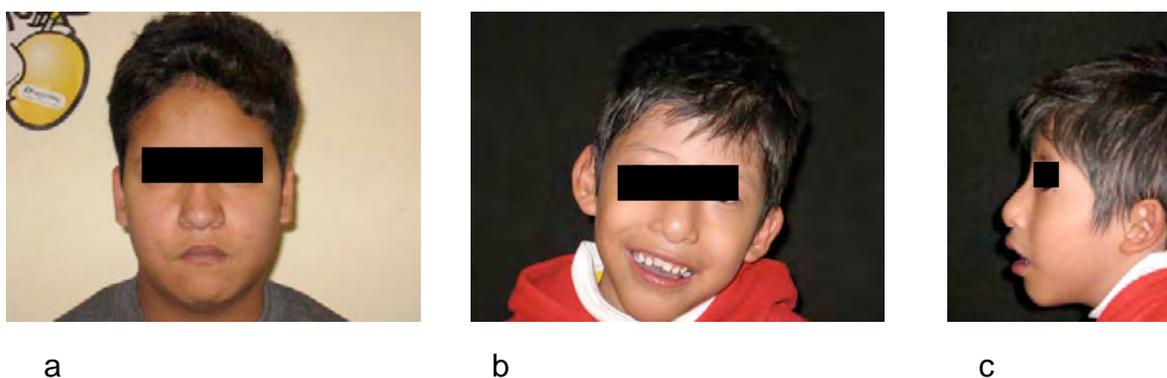


FIGURA 12. Se muestran 2 pacientes con del22q11.2. a) Nótese la cara alargada, la raíz nasal prominente, punta nasal bulbosa, comisuras labiales hacia abajo; b) y c) Nótese la cara alargada, frente estrecha, raíz nasal prominente, punta nasal bulbosa, filtrum corto, dientes pequeños, retrognatia y pabellones auriculares en reposición. Las fotografías clínicas fueron tomadas con consentimiento informado.

Todos los pacientes con SVCF tenían cardiopatía siendo la más frecuente la comunicación interventricular (CIV) y 17 de ellos presentaban dificultades en el aprendizaje (70.8%) así como retraso en el lenguaje en 20 (83.3%); voz nasal en 12 (50%); alteraciones en manos en 16 (67%); las alteraciones endocrinológicas solo estuvieron presentes en 4 (16.7%) al igual que otras alteraciones. (Tablas VI a XIII)

TABLA VI. CRANEOFACIAL

HALLAZGO	SVCF (24)		TF (17)	
Cara alargada	24	100%	8	47.1%
Frente estrecha	24	100%	5	29.4%
Dientes pequeños	17	70.8%	-	-
Paladar alto	11	45.8%	2	11.8%
Comisura labial hacia abajo	14	58.3%	-	-
Fíltrum corto	13	54.2%	-	-
Retrognatia	5	20.7%	-	-

TABLA VII. OJOS

HALLAZGO	SVCF (24)	
Epicanto	24	100%
Telecanto	24	100%
Fisuras estrechas	24	100%
Vasos retineanos tortuosos	1	4.2%

TABLA VIII. NARIZ

HALLAZGO	SVCF (24)		TF (17)	
Puente nasal prominente	24	100%	4	23.5%
Punta bulbosa	24	100%	1	5.9%
Narinas estrechas	9	37.5%	-	-

TABLA IX. PABELLONES AURICULARES

HALLAZGO	SVCF (24)	
Lóbulo pegado	2	8.3%
Pabellones pequeños	13	54.2%
Pabellones en retroposición	10	41.7%
Hipoacusia	1	4.2%

TABLA X. CARDIOLÓGICO

HALLAZGO	SVCF (24)		TF (17)	
CIV	10	41.7%	-	-
CIA	4	16.6%	-	-
TF	5	20.7%	17	100%
Tronco arterioso	2	8.3%	-	-
PCA	3	12.5%	-	-
Atresia pulmonar	2	8.3%	-	-
Interrupción arco aórtico	2	8.3%	-	-

TABLA XI. EXTREMIDADES

HALLAZGO	SVCF (24)	
Manos pequeñas	14	58.3%
Sindactilia	1	4.2%
Polidactilia	1	4.2%

TABLA XII. ENDOCRINOLÓGICO

HALLAZGO	SVCF (24)	
Hipocalcemia	3	12.5%
Hipotiroidismo	1	4.2%

TALBA XIII. OTRAS

HALLAZGO	SVCF (24)	
Dificultad para aprendizaje	17	70.8%
Retraso en el lenguaje	20	83.3%
Voz nasal	12	50%
Escoliosis	3	12.5%
Hernia inguinal	1	4.2%

De los 41 cariotipos y estudios por técnica de FISH 17 fueron de pacientes con TF, de éstos se cuenta con 13 análisis por cariotipo convencional con bandas GTG normal, únicamente 1 paciente presentó la del22q11.2. Se realizaron 24 estudios en pacientes con diagnóstico de SVCF de los cuales todos tuvieron cariotipo convencional con bandas GTG normal y de estos 6 presentaron la del22q11.2. El estudio a los padres de los pacientes positivos para la delección se está llevando a cabo. (Fig.13 y Fig.14)

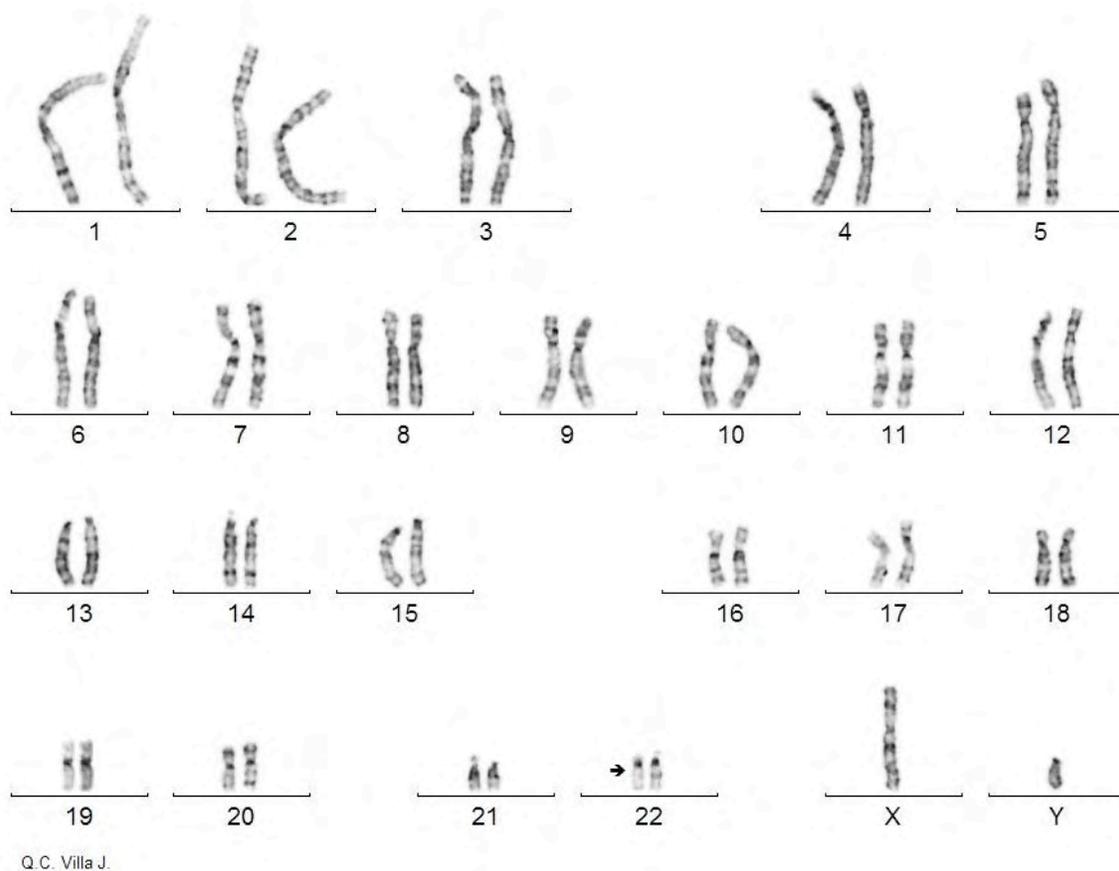


FIGURA 13. Estudio de cariotipo con técnica convencional de bandas GTG de uno de los pacientes con características clínicas de SVCF en que posteriormente se confirmó la del22q11.2 por la técnica de FISH.



FIGURA 14. Paciente con diagnóstico de SVCF. Nótese en las Fig.14a y 14b (vista frontal y lateral) la apariencia facial distintiva con frente estrecha, raíz nasal prominente, punta nasal bulbosa, telecanto, filtrum discretamente proyectado, retrognatia y dismorfia de pabellones auriculares. En la Fig. 14c (análisis por técnica de FISH normal: presentes las regiones en estudio y las controles) las señales verdes representan la sonda de control en el cromosoma 22 y las señales rojas la sonda TUPLE1 para la del22q11.2. Fig. 14d Nótese que uno de los cromosomas 22 muestra la señal de color verde (control; flecha blanca) y no la señal roja (sonda para la del22q11.2; flecha amarilla). Por lo anterior, se concluye que el análisis por la técnica de FISH en esta paciente fue positivo para la del22q11.2.

X.- DISCUSION

El SVCF es conocido desde la década de los 50's por las descripciones de Sedlacková y desde 1993 tanto este síndrome como un espectro clínico de diversas entidades que comparten algunas características ha sido asociado a la del22q11.2

La región implicada ha sido asociada a CC del tipo de la TF, si bien las bases moleculares y el patrón de estas son complicadas por el hecho de que puede presentar un patrón de herencia multifactorial o más aún, cuando consideramos que incluso aquellos casos en que se consideraba una situación aislada, a la revisión intencionada se han hecho los diagnósticos de entidades sindrómicas, incluso del tipo de SVCF.

La del22q11.2 citogenéticamente puede afectar una región que va de 1.5 a 3 Mb, siendo esta última la reportada con mayor frecuencia en diferentes series y la que generalmente se estudia en los pacientes con sospecha clínica de síndrome de del22q11. A su vez, esta alteración es la más frecuentemente reportada estando presente en 1:4000 RNV. (Carlson C, 1997; Scambler P, 2000; Yamagishi H. 2002) Consideremos además que la frecuencia de la del22q11.2 es aún mayor en grupos de población seleccionados por ejemplo en aquellos con CC específicas o con sospecha diagnóstica asociada que va en un espectro clínico desde el SVCF al SDG.

En nuestro país desde hace varios años diferentes grupos médicos han realizado estudios que incluyen el diagnóstico por técnica de FISH en particular con la sonda TUPLE1 específicamente para la delección de 3Mb. Sin embargo a la fecha no hay reportes sobre la frecuencia encontrada en nuestra población, esta aseveración es complicada por el hecho de que la mayoría de los grupos se encuentran en Instituciones de 3er nivel en diferentes regiones del país que por definición son centros de concentración por lo cual no puede extrapolarse los resultados a toda la población si no específicamente referirse a la población que atiende ese centro, como es el caso de nuestro Hospital.

Las frecuencias reportadas en la literatura mundial para otros países varían según el diagnóstico clínico de los pacientes. En nuestro estudio se incluyeron los pacientes que acudieron en un periodo de 2 años 5 meses al HIMFG en quienes se hizo estudio por la técnica de FISH con la sonda TUPLE1 para del22q11.2, se incluyeron finalmente 41 pacientes principalmente con los diagnósticos de TF o SVCF.

La relación entre hombres y mujeres para ambas entidades fue prácticamente similar con 41.7% de varones para SVCF y 53% para TF, lo que era de esperarse ya que el SVCF tiene un patrón de herencia autosómico dominante.

Los estados de donde provenían los pacientes correspondieron principalmente a las entidades en que esta situado el HIMFG (D.F.) y área metropolitana (Edo. de México), si bien se contó con 16 casos (39.02%) de estados vecinos y del sur del país, área de atención en general del HIMFG. Por las razones dadas de ser un Hospital de concentración de 3er nivel no puede concluirse que solo estas regiones presenten esta patología. Si consideramos que el promedio de consulta del Departamento de Genética es de 3500 consultas anuales aproximadamente y que se identificaron 85 casos en dos años, éstos corresponden en promedio al 1.21% de las solicitudes de atención sin embargo esto no es exacto.

Las edades de atención fueron las más frecuentes de 5 años para SVCF y de 1 a 4 años y 7 años para TF, esto llama la atención porque parecería ser que los casos tanto de SVCF como de TF no fueron en esta población tan severos como en reportados en otras series ya que no se buscó atención hasta que los pacientes fueron mayores y por ello se deduce que no hubo sintomatología o datos de alarma para los padres o no se sospechó el diagnóstico por los médicos tratantes que indujeran su referencia a un hospital de 3er nivel.

En relación al diagnóstico clínico los 24 pacientes con SVCF tuvieron *fascies* característica o peculiar que fue uno de los parámetros tomados en cuenta para el diagnóstico y posteriormente su estudio citogenético. De los pacientes estudiados no hubo datos en la evaluación o antecedentes que hicieran sospechar casos familiares.

En los parámetros para determinar una *fascies* característica se tomaron en cuenta diferentes variables, casi todos los pacientes con SVCF todos tuvieron una cara alargada, frente estrecha y epicanto y telecanto con fisuras palpebrales estrechas y la raíz nasal prominente con punta bulbosa. Las dismorfias a otros niveles fueron menos frecuentes por ejemplo hubo manos pequeñas (sin llegar a braquidactilia) en 14 pacientes (58.3%) las cuales podrían considerarse como datos de apoyo para sospechar el diagnóstico. Solamente un paciente fue reportado como con hipotiroidismo y otro con hipocalcemia, sin integrarse un diagnóstico de SDG. Setenta y uno por ciento de los pacientes con diagnóstico de SVCF presentaron problemas en el aprendizaje y 83.3% tuvieron alteración en el lenguaje, ambas características clínicas son de las principales manifestaciones presentes en el SVCF.

De los 17 pacientes con diagnóstico de TF “aislada”, a la revisión intencionada 8 casos presentaron alguna dismorfia, en particular 3 de ellos tuvieron más de una característica asociada sin completarse un diagnóstico de SVCF. Es interesante que solamente 1 caso de TF estuvo asociado a del22q11.2 y no fue ninguno de estos 3 casos. La literatura mundial reporta que los casos de TF se asocian en 6 al 35%. En nuestra serie, si bien el número de pacientes atendidos hasta la fecha es muy pequeño, el porcentaje es de 5.88% que sería similar a lo reportado por (Momma K, 1999; Botto L, 2003)

La presentación de CC llama la atención en particular porque la literatura mundial reporta una frecuencia de hasta 85% de los casos de SVCF se asocian a CC. (Scambler P, 2000) Debe considerarse también que existe un número variable de pacientes en las diferentes series reportadas algunas incluso menores que la nuestra en donde se contrasta este dato, si bien nuestra muestra de pacientes con SVCF es relativamente pequeña, parecería ser que en nuestra población las CC son un dato frecuentemente asociado a SVCF como era de esperarse.

En relación a los pacientes con SVCF de 24 análisis realizados, 6 fueron positivos para la del22q11.2 por FISH con la sonda TUPLE1. La proporción de pacientes con SVCF y del22q11 varía de 80 a 90% de los casos lo que contrasta con nuestra serie ya que en esta se encontró en 25% de los casos. (Goldmuntz E, 1997, Ben-Shachar S, 2008) Este dato es

importante porque por una parte nos permite un diagnóstico citogenético y por ende nos da fundamentos para el asesoramiento genético, sin embargo no debemos perder de vista que el SVCF puede ser causado por deleciones en esta región que la sonda TUPLE1 no detectaría y que ya que presentan el fenotipo clínico de sospecha debería descartarse otra región asociada con la sonda LSI N25 que cubre la región delecionada de 1.5 Mb. Además se sabe que mutaciones en el gen *TBX1* se asocian a la presentación de la patología y por las características de este estudio no podemos descartar.

Para continuar el asesoramiento genético de los pacientes, se tomará muestra a los padres de los casos positivos a la deleción para determinar si se trata de un evento de novo o si se trata como se ha descrito en la literatura de casos familiares, autosómicos dominantes con un fenotipo leve por la variabilidad de expresión.

En resumen en este estudio se describe la experiencia hasta la fecha del Departamento de Genética del HIMFG en el análisis clínico y citogenética por la técnica de FISH con la sonda TUPLE1 de pacientes con patologías asociadas a la del22q11.2. Se determinó que en un grupo de 24 pacientes de un Hospital de concentración y de 3er nivel de atención con diagnóstico clínico de SVCF, las características distintivas y la CC estuvieron presentes en 100% de los casos y 25% de ellos se asoció por diagnóstico citogenético por técnica de FISH a la del22q11.2. En cuanto al grupo de 17 pacientes con diagnóstico de TF “aislada”, en 3 de ellos se encontraron dismorfias, y uno de ellos (5.88%) fue positivo para la deleción 22q11.2. En los pacientes con análisis por técnica de FISH con resultado negativo para la deleción, no se descarta que otras regiones del cromosoma 22 pudiesen estar afectadas o inclusive mutaciones en genes específicos, estas circunstancias fueron consideradas para proporcionar asesoramiento genético a los pacientes.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

1. Amati, F. et al. Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet* **7**, 903-909: 1999.
2. Asim Bashir, M. et al. 22q11 Deletion in children with cleft lip and palate – is routine screening justified?. *J Plastic Recons and Aesth. Surg* **61**, 130-132: 2008.
3. Baldini, A. The 22q11.2 deletion syndrome: a gene dosage perspective. *Scientific world journal* **6**, 1881-1886: 2006.
4. Ben-Shachar, S. et al. 22q11.2 Distal Deletion: A Recurrent Genomic Disorder Distinct from DiGeorge Syndrome and Velocardiofacial Syndrome. *Am J Hum Genet.* **82**(1), 214-221: 2008.
5. Botto, L. et al. A Population-Based Study of the 22q11.2 Deletion: Phenotype, Incidence, and Contribution to Major Birth Defects in the Population. *Pediatrics.* **112**, 101-107: 2003.
6. Carlson, C. et al. Molecular Definition of 22q11 Deletions in 151 Velo-Cardio-Facial Syndrome Patients. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 620-629: 1997.
7. Dallapiccola, B. et al. How Many Breaks Do We Need to CATCH on 22q11?. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 7-11: 1996.
8. Driscoll, D. et al. Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implicatios for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J. Med. Genet.* **30**, 813-817: 1993.
9. Edelman, L. et al. Low-Copy Repeats Mediate the Common 3Mb Deletion in Patients with Velo-cardio-facial Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1076-1086: 1999.
10. Eliez, S., Antonarakis, S.E., Morris, M.A., Dahoun, S.P. & Reiss A.L. Parental origin of the deletion 22q11.2 and brain development in velocardiofacial syndrome: a preliminary study. *Arch Gen Psychiatry.* **58**(1), 64-68: 2001.
11. Fishman, M.C. & Chien, K.R. Fashioning the vertebrate Herat: earliest embryonic decisions. *Development.* **124**, 2099-2117: 1997.
12. Gámez, J. & Palacios J. “Introducción a la Pediatría” Méndez Editores 6ª Ed. 507: 2000

13. Goldmuntz, E. et al. Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects. *J. Med. Genet.* **30**, 807-812: 1993.
14. Goldmuntz, E. & Emanuel, B.S. Genetic disorders of cardiac morphogenesis. The DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Circ Res.* **80**(4), 437-443: 1997.
15. Goldmuntz, E. et al. Frequency of 22q11 Deletions in Patients with Conotruncal Defects. *JACC.* **32**(2), 492-498: 1998.
16. Heather, E., McDermid, E. & Morrow, B. Genomic Disorders on 22q11. *Am J Hum Genet.* **70**(5), 1077-1088: 2002.
17. Henwood, J. et al. A region of homozygosity within 22q11.2 associated with congenital heart disease: recessive DiGeorge/velocardiofacial syndrome?. *Am J Med Genet.* **38**, 533-536: 2001.
18. Hofbeck, M. et al. Clinical relevance of monosomy 22q11.2 in children with pulmonary atresia and ventricular septal defect. *Eur J Pediatr.* **158**, 302-307: 1999.
19. Hoffman, J.I. & Kaplan, S. The incidence of congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology* . **39**(12), 1890-1900: 2002.
20. Hutson, M.. et al. Seminars in Cell and Developmental Biology Model Systems for the Study of Heart Development and Disease Cardiac Neural Crest and Conotruncal Malformations. *Semin Cell Dev Biol.* **18**(1), 101-110: 2008.
21. Kapadia, R. & Bassett, A. Recognizing a common genetic syndrome: 22q11.2 deletion syndrome. *CMAJ.* **178**(4), 391-393: 2008.
22. Kobrynski, L. & Sullivan, K. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet.* **370**, 1443-1452: 2007.
23. Korf, B "Human Genetics and Genomics" 3^a ed. 2006
24. Lindsay, E. et al. Molecular Cytogenetic Characterization of the DiGeorge Syndrome Region Using Fluorescence *in situ* Hybridization. *Genomics.* **17**, 403-407: 1993.
25. Matsuoka, R. et al. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Human Genetics.* **103**, 70-80: 1998.
26. Maynard, T. et al. *RanBP1*, a velocardiofacial/DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed at sites of mesenchymal/epithelial induction. *Mechanisms of Development.* **111**, 177-180: 2002.

27. McInnes, R. & Michaud, J. Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics. Clin Genet. **65**, 163-174: 2004
28. Momma, K. et al. Aortic Arch Anomalies Associated with Chromosome 22q11 Deletion (CATCH22). Pediatr. Cardiol. **20**, 97-102: 1999.
29. Momma, K. et al. Truncus Arteriosus with 22q11 Deletion. JACC. **30**(4), 1067-1071: 1997.
30. Moore, C. Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations. Encyclopedia of Life Sciences. 1-8: 2001.
31. Moore, K. Embriología Clínica. Interamericana 2ª Ed, 159-190: 1979.
32. Morris, R. et al. Chromosome 22q11 Deletion Síndrome. Am J Psychiatry. **154**(4), 527: 2002.
33. Morrow, B. Microdeletions and Microduplications: Mechanism. Encyclopedia of Life Sciences. 1-5: 2005.
34. Nussbaum, R. et al. "Thompson & Thompson Genetics in Medicine" W.B. Saunders Company 6ª Ed. 135-150: 2001.
35. Óskarsdóttir, S. et al. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. Arch. Dis. Child. **89**, 148-151: 2004.
36. Savage John: Chromosome Rearrangements. Encyclopedia of Life Sciences. 1-7: 2001.
37. Sánchez-Urbina, R. et al. Trascendencia de los factores ambientales y genéticos en cardiopatías congénitas: el caso de la enzima MTHFR. Perinatol Reprod Hum **20**, 39-47: 2006.
38. Scambler, P. The 22q11 deletion syndromes. Hum Mol Genet. **9**(16), 2421-2426: 2000.
39. Scambler, P. et al. Microdeletions within 22q11 Associated with Sporadic and Familial DiGeorge Syndrome. Genomics. **10**, 201-206: 1991.
40. Shaikh, T. et al. Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: Sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. Genome Res. **17**, 482-491: 2007.
41. Srivastava, D. & Olson, E. A genetic blueprint for cardiac development. Nature. **407**, 221-226: 2000.

42. Stevenson, R. "Human Malformations and Related Anomalies" Vol II, Oxford Monographs on Medical Genetics No 27, New York Oxford 1993.
43. Swillen, A. et al. The behavioural phenotype in velo-cardio-facial syndrome (VCFS): from infancy to adolescence. *Genetic Counseling*. **10**(1), 7988: 1999.
44. Turnpenny, P. Deletion 22q11 syndrome: acknowledging a lost eponym as we say farewell to an acronym. *J Med Genet*. **38**, 271-272: 2001.
45. Vantrappen, G. The velo-cardio-facial syndrome: the otorhinolaryngeal manifestations and implications. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. **45**, 133-141: 1998.
46. Wadey, R. et al. Mutations of *UFDIL* Are Not Responsible for the Majority of Cases of DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome without Deletions within Chromosome 22q11. *Am. J. Hum. Genet*. **65**, 247-249: 1999.
47. Waldo, K.L., Kumiski, D.H., Wallis, K.T., Stadt, H.A., Hutson, M.R., Platt, D.H. et al. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. **128**, 3179-3188: 2001.
48. Wilson, D. et al. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*. **30**, 852-856: 1993.
49. Yamagishi, H. The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med*. **51**(2), 77-88: 2002.
50. Vysis Catalog Product. Abbott Molecular Inc. March: 2005
51. www.nicbi.nlm.nih.gov/OMIM