



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**“IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES EN EL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS (CNVs) EN PACIENTES CON TETRALOGÍA DE FALLOT”**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA:**  
ADOLFO AGUAYO GÓMEZ

**TUTOR PRINCIPAL:**  
DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MEXICO, D.F. JUNIO 2014



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.



## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	7
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	8
1.2.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS .....	8
1.2.2 SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN MÉXICO .....	10
1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA TETRALOGÍA DE FALLOT .....	11
1.2.4 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD .....	12
1.3 DESARROLLO Y MORFOGÉNESIS DEL CORAZÓN.....	13
1.4 ANATOMÍA BREVE DE LAS CÁMARAS CARDIACAS DEL CORAZÓN ADULTO .....	14
1.5 EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO MOLECULAR DEL CORAZÓN.....	17
1.5.1 FORMACIÓN DEL MESODERMO CARDIOGÉNICO.....	17
1.5.2 FORMACIÓN DEL TUBO CARDÍACO.....	24
1.5.3 ELONGACIÓN DEL TUBO CARDÍACO.....	28
1.5.4 CRECIMIENTO TEMPRANO Y FLEXIÓN DEL CORAZÓN EMBRIONARIO.....	29
1.5.5 ANÁLISIS DE LOS LINAJES CELULARES DEL PRIMER Y SEGUNDO CAMPOS DEL DESARROLLO CARDIACOS.....	33

1.5.6 DESARROLLO DE LAS CÁMARAS CARDÍACAS .....	37
1.5.7 DESARROLLO DEL MARCAPASO Y EL SISTEMA DE CONDUCCIÓN CARDÍACOS.....	41
1.5.8 FORMACIÓN DE LOS SEPTUMS CARDÍACOS.....	45
1.5.9 DESARROLLO DEL POLO ARTERIAL DEL CORAZÓN.....	46
1.5.10 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL SEGUNDO CAMPO DEL DESARROLLO CARDÍACO.....	47
1.5.11 CARACTERÍSTICAS Y DESARROLLO DEL SEGUNDO CAMPO DEL DESARROLLO CARDÍACO.....	56
1.6 FACTORES DE RIESGO NO GENÉTICOS PARA CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS .....	68
1.6.1 CONDICIONES O CARACTERÍSTICAS DE LOS PROGENITORES...	68
1.6.2 EXPOSICIONES MATERNAS A MEDICAMENTOS TERAPÉUTICOS	71
1.6.3 EXPOSICIONES A DROGAS .....	72
1.6.4 EXPOSICIONES A CONTAMINANTES AMBIENTALES.....	72
1.7 FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS .....	74
1.7.1 ESTUDIOS DE AGREGACIÓN FAMILIAR .....	74
1.7.2 GENES ASOCIADOS CON TETRALOGÍA DE FALLOT (TF).....	76
1.7.3 ESTUDIOS SOBRE VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS (CNVs) Y TETRALOGÍA DE FALLOT.....	81
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	87

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	87
2.3 OBJETIVO SECUNDARIO .....	87
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	88
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	88
3.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA .....	88
3.3 VARIABLES .....	88
3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	89
3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	89
3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	89
3.4.3 CRITERIO DE ELIMINACIÓN.....	90
3.5 DIAGNÓSTICO, ENCUESTA CLÍNICO-GENÉTICA Y TOMA DE MUESTRA .....	90
3.6 MÉTODOS DE LABORATORIO.....	91
4. RESULTADOS .....	93
5. DISCUSIÓN .....	95
6. ANEXOS .....	98
6.1 TABLAS Y FIGURAS.....	98
6.2 SONDAS INCLUÍDAS EN EL KIT SALSA MLPA P311-A1 CHD.....	102
6.3 SONDAS INCLUÍDAS EN EL KIT SALSA MLPA P250-B1 .....	104
6.4 PROTOCOLO PARA LAS REACCIONES DE MLPA.....	107

6.5 PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN DE SANGRE TOTAL.....	111
6.6 PROTOCOLO PARA PURIFICACIÓN DE ADN POR PRECIPITACIÓN EN ETANOL. ....	113
6.7 ENCUESTA CLÍNICO GENÉTICA.....	115
7. BIBLIOGRAFÍA	

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La primera descripción de las características anatómicas de la tetralogía de Fallot (TF) fue realizada por el científico y anatomista danés Niels Stensen en un feto con ectopia cordis en 1671 [1]. Otros anatomistas describieron hallazgos similares: Edward Sandifort (1777) [2], William Hunter (1784) [3], Farre (1814) [4] y Thomas Peacock (1846) [5].

Étienne-Louis Arthur Fallot (1850-1911), médico francés, en 1888 publicó una serie de trabajos en *Marseille Médical Journal* describiendo las características anatómicas y el proceso patológico de la TF (*L'anatomie pathologique de la Maladie Bleue*) [6]. En estos trabajos, Fallot propuso la existencia de un proceso patológico que ocurría durante el desarrollo fetal y determinaba la asociación no aleatoria de cuatro (tetralogía) características anatómicas: (1) defecto septal ventricular o comunicación interventricular (CIV), (2) cabalgamiento de la raíz aortica, (3) obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho e (4) hipertrofia del ventrículo derecho [6].

Fallot llamó a esta condición la enfermedad azul (del francés: *maladie bleue*) o cianosis cardiaca (del francés: *cyanose cardiaque*) debido a la presencia de la cianosis en los pacientes que tenían las cuatro características anatómicas



mencionadas. Sin embargo, el epónimo “Tetralogía de Fallot” fue usado por primera vez en 1924 por Maude Elizabeth Seymour Abbott (1869-1940) pediatra, cardióloga y patóloga quien utilizó el término como parte de su clasificación de cardiopatías congénitas [7].

## 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

### 1.2.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

Las cardiopatías congénitas<sup>1</sup>(CC) son el defecto más común al nacimiento en el mundo y representan casi un tercio de todos los defectos congénitos mayores [8]. La prevalencia de CC se estima en casi 1% de los nacidos vivos (NV) y alrededor de 10% en mortinatos [9-14]. Sin embargo, excluyendo válvula aortica bicúspide (prevalencia de 1-2% [15]) la prevalencia general de CC es de 8-9/1000 NV [8], aunque existe una gran variación entre diferentes estudios que va de 4 a 50 por 1000 NV [16, 17].

En adultos, la prevalencia estimada es de 3/1000 adultos aproximadamente [18, 14], es decir alrededor de 21 millones de adultos con CC en el mundo [14].

---

<sup>1</sup> Como definición de cardiopatía congénita se utilizará la de Mitchell y cols: *Una anomalía estructural evidente del corazón o de los grandes vasos intratorácicos con una repercusión real o potencial sobre la salud.*

Actualmente más de 75% de los niños que sobreviven al primer año de vida vivirán hasta la edad adulta [19, 20].

La prevalencia total de CC parece estar incrementándose a través del tiempo y las razones de esto no son claras [21, 22]. Van der Linde y cols [8] observaron que la prevalencia se incrementó de 0.6 (IC 95% 0.4-0.8) a 9.1 (IC 95% 9.0-9.2) por 1000 NV, de los años 1930-1934 al periodo posterior a 1995. Los defectos septales y la persistencia del ducto arterioso presentaron el mayor incremento en la prevalencia a través del tiempo. Sin embargo, esta tendencia llegó a un punto de estabilidad en los últimos 15 años, con una prevalencia sostenida en 9/1000 NV.

La prevalencia de CC difiere dependiendo de las regiones geográficas estudiadas [23]. Por ejemplo, Asia tiene la prevalencia más alta de CC (9.3/1000 (IC 95% 8.9-9.7)). Europa tuvo una mayor prevalencia que Norteamérica, con 8.2 (IC 95% 8.1-8.3) vs 6.9 (IC 95% 6.7-7.1) por 1000, respectivamente. La CC más frecuente es la CIV con 2.62 (IC 95% 2.59-2.65) por 1000, mientras que la TF tuvo una prevalencia de 0.34 (IC 95% 0.34-0.37) por 1000 nacidos vivos [8].

Si bien la prevalencia de CC es diferente entre países o regiones, no sucede lo mismo entre grupos étnicos o razas en quienes la prevalencia es similar. Nembhard y cols estudiaron a 9,352 niños con CC de diferentes razas del registro

de defectos al nacimiento de Florida, Estados Unidos<sup>2</sup> y no observaron diferencias en la prevalencia de CC entre hispanos, caucásicos y negros: 8, 7.9 y 7.7 por 1000 NV, respectivamente [24].

A pesar de que algunos estudios sugieren que no hay grandes diferencias entre grupos étnicos o razas en las prevalencias de CC, estas diferencias se acentúan cuando son analizadas por tipo de CC. Por ejemplo, los niños de raza negra presentan una mayor tasa de estenosis tricúspide (Razón de Prevalencias (RP):<sup>3</sup> 1.53) y pulmonar (RP 1.68); y menor de estenosis aórtica (RP 0.46) y defectos del septum ventricular (RP 0.87). Los niños hispanos tienen una menor tasa de estenosis aórtica (0.53) y defectos del septum ventricular (RP 0.65). Cabe mencionar que la prevalencia de TF no presenta diferencias significativas entre los grupos estudiados (hispanos 4.59/10,000 (IC 95% 3.87-5.49), raza negra 5.02 y caucásicos de 5.34) [24].

## 1.2.2 SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN MÉXICO

---

<sup>2</sup> Registro de Defectos al Nacimiento de Florida, Estados Unidos, de 1998 a 2003

<sup>3</sup> RP (Razón de Prevalencias): Calculado como la tasa de prevalencia de los niños de raza negra e hispanos dividida entre la tasa de prevalencia de los niños de raza blanca.

En México se desconoce la prevalencia real de las CC. La poca información que se conoce proviene de las tasas anuales de mortalidad del Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI) y del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). En estos registros se reporta que en las últimas dos décadas se ha incrementado la mortalidad relacionada con CC en niños menores de 5 años. Por ejemplo, en menores de un año las CC ocuparon el sexto lugar (1990), cuarto (2002) y segundo (desde 2005 y hasta 2010) como causas de muerte. Y en niños entre uno y cuatro años fueron la novena (1990), tercera (2002) y cuarta (desde 2006) [[25](#), [26](#)].

Sin embargo, aun cuando no se dispone de una prevalencia real de CC en México, Calderón-Colmenero y cols estimaron que el promedio teórico, derivado de la información mundial es de 8/1000 nacidos vivos. Por lo tanto, considerando la tasa anual de natalidad en México (~19/1000), se calcula que cada año nacen entre 18 mil y 21 mil niños con algún tipo de malformación cardiaca [[25](#)].

### 1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA TETRALOGÍA DE FALLOT

La Tetralogía de Fallot es la CC cianógena más frecuente, tiene una prevalencia de ~3/10,000 nacidos vivos o ~1/3600 nacidos vivos [[27-29](#)]. Representa del 3-10% de todas las cardiopatías congénitas [[30](#)]. Y constituye el 60% de las

cardiopatías conotruncales, si se excluye la transposición de las grandes arterias [31].

Es la lesión congénita cardíaca que con mayor frecuencia requiere intervención quirúrgica en el primer año de vida. Con la reparación temprana alcanza una supervivencia de 86% a 32 años post-intervención [32]. Existe una moderada preponderancia en varones para la enfermedad, con una relación varón:mujer de 1.42 [33, 34, 29, 35].

#### 1.2.4 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

La historia natural de la Tetralogía de Fallot sin la presencia de otras anomalías asociadas es variable y depende de la gravedad de la obstrucción de salida del ventrículo derecho. Sin tratamiento quirúrgico el 25% de los niños mueren dentro del primer año, 40% a los tres años, 70% a los diez años. El riesgo de muerte es mayor en el primer año de vida. Después del primer año el riesgo es constante hasta los 25 años, cuando se incrementa [36]. Las principales causas de muerte en pacientes sin tratamiento quirúrgico son: ataque hipóxico (62%), accidentes cerebrovasculares (17%) y abscesos cerebrales (13%) [37].

### 1.3 DESARROLLO Y MORFOGÉNESIS DEL CORAZÓN

La maquinaria transcripcional y molecular que controla el desarrollo del corazón es enormemente compleja y sensible a diversos factores genéticos y ambientales. Esto es reflejado por la elevada prevalencia de CC. En consecuencia y para comprender la etiología de las malformaciones cardíacas es necesario conocer los procesos del desarrollo cardíaco.

El corazón es el primer órgano funcional en el embrión en desarrollo. Inicialmente se presenta como una bomba muscular en forma de tubo. La sangre es impulsada desde el polo caudal o venoso en dirección hacia el polo craneal o arterial [38]. La agregación de células en ambos polos provocará la elongación del tubo cardíaco.

Las células miocárdicas primarias que constituyen el tubo cardíaco en esta etapa iniciarán posteriormente la proliferación y diferenciación de regiones que darán lugar a las cámaras cardíacas, mientras subregiones de miocardio se diferenciarán en el sistema de conducción. Complejos procesos morfogenéticos dirigen la transformación de la forma tubular primitiva en un corazón compuesto de cuatro cámaras, válvulas cardíacas, entradas venosas y salidas arteriales.

El desarrollo anormal de cualquiera de los diferentes componentes cardíacos puede ocasionar cardiopatías congénitas. Entre las malformaciones más comunes están las involucran a las grandes arterias y el ventrículo derecho. Hasta el momento, los mecanismos moleculares implicados en su patogénesis no son totalmente comprendidos [39].

#### 1.4 ANATOMÍA BREVE DE LAS CÁMARAS CARDIACAS DEL CORAZÓN ADULTO

El corazón es una bomba muscular que se contrae de forma rítmica para impulsar la sangre a través del cuerpo, estableciendo un sistema circulatorio vital para el funcionamiento del organismo. El corazón adulto está compuesto de cuatro cámaras, dos aurículas y dos ventrículos, separados uno de otro por un septum que evita la mezcla de la sangre oxigenada y desoxigenada. El flujo unidireccional de la sangre es garantizado por las válvulas cardíacas. La sangre desoxigenada llega a la aurícula derecha por medio de las venas cavas superior e inferior y pasa por la válvula tricúspide para ingresar al ventrículo derecho, en seguida es enviada a los pulmones a través del tronco pulmonar y sus ramas. Esta parte del sistema circulatorio es conocida como la circulación pulmonar.

La sangre oxigenada por los pulmones regresa por las venas pulmonares a la aurícula izquierda. Después cruza la válvula mitral en dirección al ventrículo

izquierdo y sale por la aorta para alimentar el sistema vascular arterial. Las aurículas y los ventrículos se contraen secuencialmente y con ello ejercen presión hacia los pulmones o el cuerpo.

La difusión adecuada del afluente sanguíneo depende en gran medida del marcapaso cardiaco y el sistema de conducción. El impulso cardiaco inicia en el nodo sinusal, el cual se localiza en la unión entre la vena cava superior y la aurícula derecha. El impulso eléctrico viaja desde el nodo sinusal sobre la aurícula hacia el nodo auriculoventricular (NAV). En este punto el impulso es retrasado, cuando viaja desde el NAV a las ramas en el septum ventricular y sus paredes. Este retraso asegura el adecuado llenado ventricular. Entonces, el impulso eléctrico causa la contracción ápex a base de los ventrículos, con la cual la sangre del ventrículo derecho entra a la circulación pulmonar y la sangre del ventrículo izquierdo entra a la circulación sistémica.

Anteriormente se creía que las cámaras cardíacas en el adulto se desarrollaban en segmentos predefinidos y crecían a partir de ahí hasta convertirse en estructuras desarrolladas [40]. Sin embargo, recientes estudios de linajes genéticos y moleculares han cambiado este punto de vista. Ahora se sabe que el corazón adulto adquiere su forma final mediante la agregación de células que residen fuera del corazón embrionario, incluyendo células cardíacas progenitoras y células derivadas de la cresta neural [41-45]. Más aún, el sistema de conducción



se origina de células miocárdicas primarias que han retenido algunas características de su fenotipo primitivo, más que provenir de diferentes precursores [\[46\]](#). La visión del desarrollo cardíaco ha cambiado en los últimos años y los progresos actuales han permitido descubrir importantes novedades tanto en la embriología cardíaca y como en la biología de las células progenitoras.

## 1.5 EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO MOLECULAR DEL CORAZÓN

### 1.5.1 FORMACIÓN DEL MESODERMO CARDIOGÉNICO

Durante la tercera semana del desarrollo en el embrión ocurre el proceso de gastrulación por el cual se establecen tres capas germinales: una dorsal la capa ectodérmica, una ventral o capa endodérmica y una capa mesodérmica situada entre las otras dos. La gastrulación inicia con la formación de una línea primitiva en la superficie del epiblasto. Al principio esta línea no está bien definida pero entre los 15 y 16 días se vuelve visible y adquiere forma de surco con regiones ligeramente abultadas en ambos lados.

La región cefálica de la línea primitiva contiene un área ligeramente elevada que rodea una pequeña fosita primitiva (Figura 1.a). Entonces las células del epiblasto migran hacia la línea primitiva y al llegar, se separan del epiblasto y se deslizan debajo de él. Este movimiento de fuera hacia adentro se conoce como invaginación (Figura 1.b). La migración y diferenciación de estas células es controlada por el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF-8).

Después de invaginarse, algunas células se desplazan al hipoblasto para formar el endodermo, otras células permanecen entre el epiblasto y el endodermo para

formar el mesodermo y por finalmente, las células del epiblasto darán lugar al ectodermo (Figura 1.b).

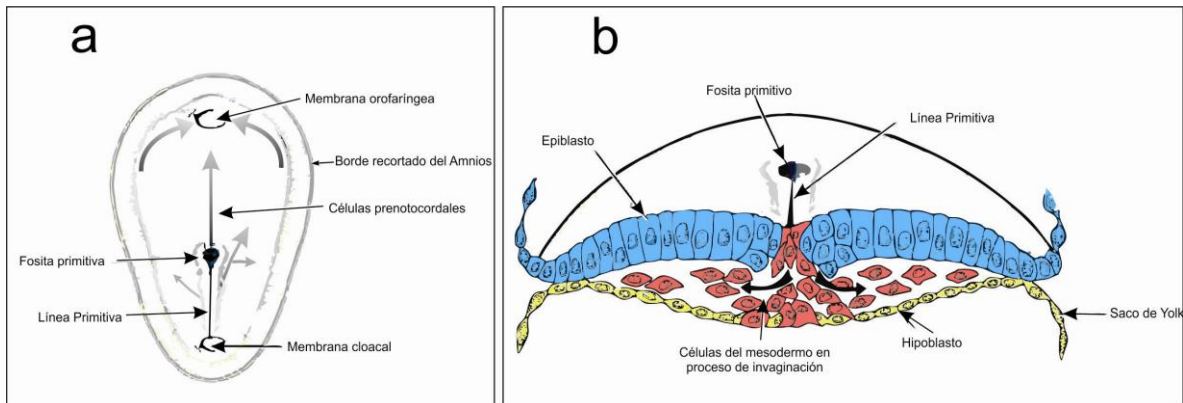


Figura 1. a. Cara dorsal del disco germinativo en un embrión de 16 días donde se muestra el movimiento de las células del epiblasto (flechas sombreadas) a través de la línea y fosita primitivas. b. Sección transversal de la línea primitiva a los 15 días, en la que se muestra la invaginación de las células del epiblasto. Las primeras células que se mueven hacia la parte interior desplazan el hipoblasto y formarán el endodermo definitivo. Las células que permanecen entre las dos capas formarán el mesodermo.

El sistema vascular inicia su desarrollo a mitad de la tercera semana en el embrión humano o alrededor del día 6 del ratón. Las células precursoras del corazón se originan del epiblasto adyacente al extremo cefálico de la línea primitiva. Desde ahí migran a través de la línea primitiva y se sitúan dentro de la placa esplácnica o placa lateral del mesodermo (Figura 1.b) [47, 48]. Estas células mesodérmicas

migran craneolateralmente para formar dos áreas de desarrollo cardiaco bilaterales, en conjunto denominadas campo del desarrollo cardiogénico primario (CDP) (Figura 2.a) [49, 50].

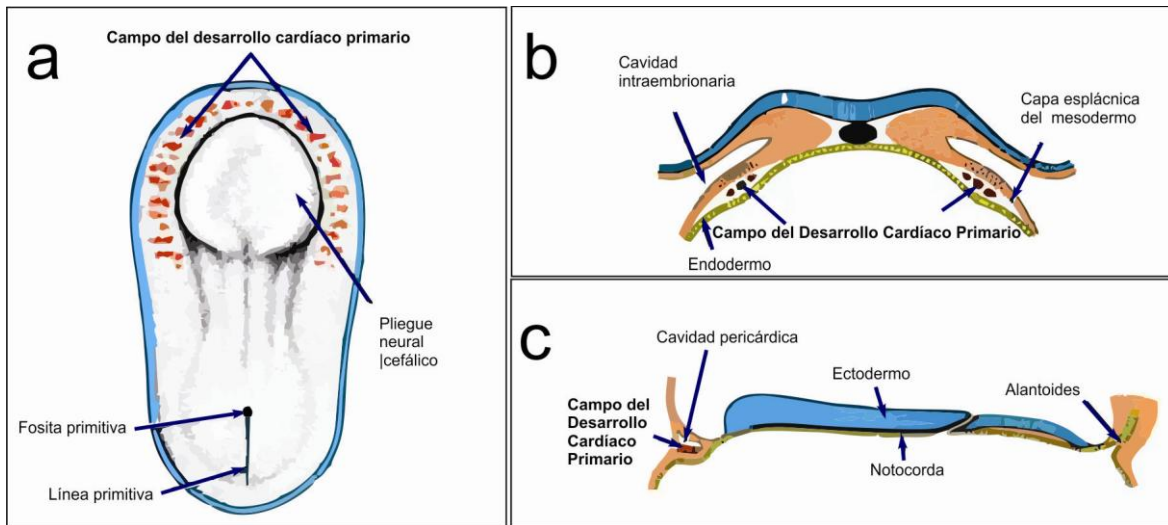


Figura 2. a Vista dorsal de un embrión presomita tardío (de aproximadamente 18 días). Las células precursoras cardíacas residen en el mesodermo visceral frente a la placa neural, a ambos lados del embrión. b. Sección transversal de un embrión en una fase de desarrollo similar que muestra la posición del campo del desarrollo cardiogénico primario en la capa esplácnica del mesodermo. c. Sección cefalocaudal de un embrión en una fase de desarrollo similar, que muestra la posición de la cavidad pericárdica y el campo cardiogénico.

Entre los días 16 y 18 en el embrión humano, las células del campo de desarrollo cardiogénico primario (CDP) iniciarán su diferenciación y darán origen a las

aurículas, ventrículo izquierdo y la mayor parte del ventrículo derecho. Un poco más tarde entre los días 20 y 21, otro grupo diferente de células migra desde el mesodermo esplácnico en la región posterior de la faringe, este es el denominado campo del desarrollo cardiogénico secundario (CDS) (figura 3). Estas células participarán en el desarrollo del tracto de salida (*conus cordis* y tronco arterioso) y parte del ventrículo derecho.

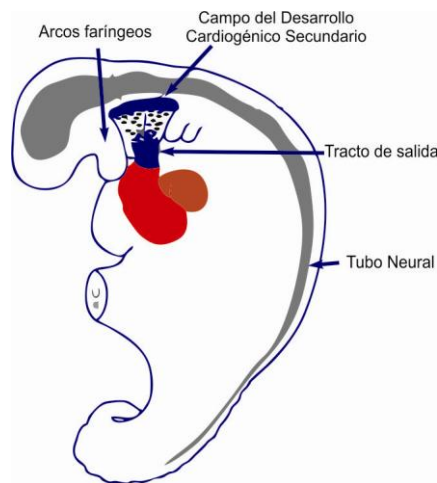


Figura 3. Esquema que ilustra el campo de desarrollo cardiogénico secundario (CDS), ubicado en el mesodermo esplácnico en la región posterior de la faringe. Las células del CDS participarán en el desarrollo del tracto de salida, que incluye parte del ventrículo derecho, el *conus cordis* y tronco arterioso.

Los programas transcripcionales que dirigen la diferenciación del mesodermo esplácnico en mesodermo cardiogénico requieren del factor de transcripción T-box

Eomesodermina (Eomes) [51]. En la etapa de línea primitiva, Eomes activa directamente el *factor mesodérmico posterior 1* (Mesp1) [52], el cual es un regulador importante de la diferenciación y migración previos a la formación del corazón temprano [53-56].

El factor de transcripción Mesp1 induce la diferenciación del mesodermo cardiogénico a través de la disminución en la expresión de genes pluripotenciales y el aumento en la expresión de factores de transcripción cardiacos, tales como: El factor de unión a dedos de zinc Gata4, la proteína homeobox Nkx2-5, el factor potenciador Mef2c y el cofactor Smarcd3 (complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF) [56]. David y cols observaron el desarrollo ectópico del corazón al inyectar RNA mensajero de *Mesp1* en embriones de *Xenopus* [57]. Asimismo, Lindsley y cols también observaron que Mesp1 induce el desarrollo de células progenitoras cardiovasculares multipotenciales a partir de células madre embrionarias *in vivo* [58].

De la misma manera que Mesp1, el factor transcripcional Mesp2 es expresado en células mesodérmicas tempranas para dar origen al mesodermo craneal y cardíaco [54]. En embriones de ratón nulos para *Mesp1* el gen *Mesp2* es altamente expresado y puede compensar la deficiencia de *Mesp1* [53] a pesar de que *Mesp1* ha demostrado ser más importante para la diferenciación cardíaca [55,

[57](#), [58](#)]. De esta forma, los embriones de ratón con deficiencia de ambos genes (*Mesp1* y *Mesp2*) no desarrollan mesodermo cardíaco [[53](#), [54](#)].

Sin embargo, a pesar de que las células mesodérmicas pueden diferenciarse en células del miocardio, éstas solo adquieren el fenotipo miocárdico cuando son estimuladas por células vecinas tanto del endodermo visceral anterior, como del ectodermo y precursores de la notocorda [[59](#), [60](#)]. La señalización de las células del endodermo visceral anterior induce la diferenciación cardíaca, mientras que la señalización de la placa neural, el mesodermo somático y axial la inhiben [[61](#)]. Las principales proteínas que participan en estas vías señalización son: hedgehog (Hh) y ligandos Wnt, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los miembros la superfamilia del factor de crecimiento transformante (Tgf) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) [[62-66](#)].

La inhibición de la diferenciación cardíaca es realizada principalmente a través de la vía Wnt, la cual es inhibida por sí misma a través de la proteína antagonista dickkopf1 (Dkk1) y crescent [[67-71](#)]. La importancia de esta inhibición para el endodermo quedó demostrada al realizar la ablación condicional de  $\beta$ -catenina endodérmica (mediador intracelular de Wnt), lo cual ocasionó la formación de múltiples *foci* cardíacos en las células del mesodermo adyacente [[72](#)]. Además, la inhibición de vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el endodermo también afecta la expresión del

factor de transcripción Hex [73], el cual, en cambio, induce la diferenciación del mesodermo adyacente en células miocárdicas.

Otros inhibidores de la diferenciación cardíaca son: Los ligandos Wnt11 y Wnt3a en el mesodermo somático, así como *noggin* y *chordin* en el tubo neural dorsal y la notocorda [67, 74]. Además, el factor de transcripción Gata6 regula a los niveles de Wnt2 [75], el cual es necesario para inducir la diferenciación del mesodermo precardiaco a través de la vía no canónica de Wnt en las células madre embrionarias [76].

Como se ha mencionado, la regulación de los precursores cardiogénicos requiere de la coordinación precisa de diferentes grupos de células, vías de señalización, proteínas y procesos del desarrollo. En este punto, cualquier defecto en alguno de estos componentes tendría un gran impacto sobre el desarrollo.



### 1.5.2 FORMACIÓN DEL TUBO CARDÍACO

Inicialmente, el área cardiogénica primitiva se sitúa por delante de la membrana bucofaríngea y la placa neural, en forma de medialuna, en la región conocida como el campo del desarrollo cardiogénico primario (CDP) (figura 2.a). Con el cierre del tubo neural y la formación de las vesículas cerebrales, el sistema nervioso central crece hacia la parte anterior y se extiende por encima del área cardiogénica. Por tanto, el crecimiento del cerebro empuja la membrana bucofaríngea hacia delante, mientras el área cardiogénica y la cavidad pericárdica primitivas son desplazados primero hacia la región cervical y después hacia el tórax.

A medida que el embrión crece sufre un proceso de plegamiento en dirección cefalocaudal y lateral. En consecuencia las regiones del mesodermo cardíaco del CDP se fusionan en la línea media para formar una estructura en forma de tubo, el denominado tubo cardíaco. Este proceso inicia entre los días 17 y 19 del embrión humano y alrededor del día 7.5 en el ratón [77].

Un poco más adelante entre los días 19-21 del embrión humano en desarrollo, la diferenciación del mesodermo esplácnico y el plegamiento del disco embrionario originan el desarrollo de una estructura en forma de tazón a partir de las regiones precursoras (fig. 3a y 3b) [78]. Entonces la fusión de las regiones bilaterales y el

desarrollo del corazón dependerán en parte también de las propiedades contráctiles del endodermo subyacente [79].

En esta etapa de forma de tazón, el corazón embrionario se compone de una capa interna de endocardio, una capa externa de miocardio y gelatina cardíaca acelular entre ambas capas (Fig 3a) [80, 78]. De tal manera que los miocardiocitos cubren la pared del mesodermo esplácnico, por medio de la gelatina cardíaca que se extiende directamente contra la pared ventral del intestino anterior (fig. 3a).

En este punto del desarrollo, el corazón tiene una apariencia simétrica bilateralmente. La porción caudal se conecta con las venas tributarias, el saco de yolk y la placenta. En seguida, es separado de la faringe ventral (Fig 3c,c', d,d'), pero mantiene un remanente de continuidad transitorio, el mesocardio dorsal (Fig. 3c',e,f,flechas). Finalmente, se forma una estructura en forma de tubo que se mantiene unido a la pared celómica por los polos arterial y venoso (Fig. 3c',d').

Simultáneamente, la parte central tubo cardíaco se expande para formar el tracto de salida y las regiones ventriculares. Así, el corazón se convierte en un tubo en expansión formado por un revestimiento endotelial interno y una capa miocárdica externa que recibe un afluente venoso en su polo caudal y bombea sangre hacia el arco aórtico y la aorta dorsal en su polo craneal.

Las células indiferenciadas del corazón cuando se encuentra en la forma de tazón son las primeras precursoras cardiacas en diferenciarse. Este grupo de células corresponde al CDP y como fue mencionado es esencial para el desarrollo del ventrículo embrionario.

Si bien, la mayor parte de las células del mesodermo cardiogénico se mantienen indiferenciadas en las áreas medial y posterior del asa cardiaca [45], estas células indiferenciadas mantienen una elevada tasa de proliferación y gradualmente son agregadas al corazón, proceso por lo cual se elonga el tubo cardíaco primitivo. Este segundo grupo de células que se agregan posteriormente corresponden al CDS debido a sus características y al retraso en su diferenciación [77].

Las vías de señalización que dirigen estos procesos del desarrollo inducen la expresión de varios factores de transcripción críticos para la diferenciación del miocardio, entre los más importantes están: Nkx2-5, Gata4, Tbx5, Hand2 y Mef2c [81-84]. Cabe señalar que las mutaciones en alguno de los genes que codifican para estos factores de transcripción son causa de cardiopatías congénitas [85]. Estos factores de transcripción con frecuencia actúan como cofactores tanto en células indiferenciadas como en células diferenciadas para regular un gran número de genes blanco. Por lo tanto, estos genes y sus factores de transcripción

deberán controlar el inicio de la diferenciación miocárdica y el destino de las células.

### 1.5.3 ELONGACIÓN DEL TUBO CARDÍACO

El campo de desarrollo cardiogénico secundario (CDS) fue descrito hace varias décadas en estudios realizados en embriones de pollo [86-88]. Sin embargo, hasta hace algunos años se demostró que el proceso de crecimiento e inicio de la diferenciación del tubo cardíaco se encuentra directamente relacionado con la migración y agregación de células al corazón [89]. Ahora se sabe que las células precursoras y los miocardiocitos tienen un modo de crecimiento proliferativo, más que un crecimiento de tipo células madre. Por lo tanto, la agregación de estas células dará lugar a la elongación del tubo cardíaco [89].

Los experimentos de rastreo de linajes celulares han permitido demostrar que las células del mesodermo faríngeo participan en la elongación del tracto de salida y se incorporan en el ventrículo derecho tanto en los embriones de ratón [90] como en pollo [44] en desarrollo. Kelly y cols observaron en embriones de ratón que algunas células del mesodermo de la faringe también muestran expresión para el transgén *Mlc1v-nlacZ-24* (integrado con el gen *Fgf10*) en el miocardio del tracto de salida y ventrículo derecho en etapas posteriores del desarrollo [41].

Por su parte, Cai y cols observaron que las células del mesodermo faríngeo se encuentran localizadas contiguas y medialmente al CDP, lo cual proporciona células precursoras para los dos polos del corazón. Lo anterior sugiere que el tubo

cardíaco se elonga a través de la incorporación de células del CDS que da origen al tracto de salida, ventrículo derecho y septum ventricular, además de parte del ventrículo izquierdo y las aurículas [91, 61, 45].

En resumen, las células precursoras del CDP son muy importantes para el desarrollo del ventrículo primitivo en el tubo cardíaco, mientras que las células del CDS son importantes para la formación y desarrollo de las estructuras restantes del corazón y en particular para la elongación del tracto de salida.

#### 1.5.4 CRECIMIENTO TEMPRANO Y FLEXIÓN DEL CORAZÓN EMBRIONARIO

Conforme el tubo cardíaco continúa su proceso de elongación, aproximadamente al día 23 se curva. La porción cefálica se dobla en dirección ventral, caudal y hacia la derecha; y la porción caudal se desplaza dorsocranealmente y hacia la izquierda. Esta flexión del tubo cardíaco forma una estructura en forma de asa, el asa cardíaca que se completa el día 28 del desarrollo.

Mientras se forma el asa cardíaca, se hacen visibles algunas expansiones a lo largo del tubo cardíaco. La porción auricular, que inicialmente es una estructura par situada fuera de la cavidad pericárdica, forma una aurícula común y se incorpora a la cavidad pericárdica. La unión auriculoventricular se estrecha y forma

el canal auriculoventricular, que conecta a la aurícula y ventrículo primitivos. El bulbo arterial o *bulbus cordis* se estrecha excepto en su tercio proximal, para dar origen a la porción trabeculada del ventrículo derecho. La parte media del cono arterial o *conus cordis*, formará el tracto de salida de ambos ventrículos. La parte distal, el tronco arterioso o *truncus arteriosus*, formará las raíces y las partes proximales de la aorta y la arteria pulmonar. Y finalmente la unión entre el ventrículo y el bulbo arterial, es marcada por el surco bulboventricular, llamado foramen interventricular primario.

De esta manera, el tubo cardíaco es organizado por regiones a lo largo de su eje cráneo-caudal desde el conotronco hasta el ventrículo derecho, el ventrículo izquierdo y la región auricular, respectivamente. La evidencia sugiere la organización de estas regiones es regulada por genes homeobox de forma similar al eje cráneo-caudal del embrión.

En el tubo cardíaco, tan pronto como es inicia la diferenciación de las células progenitoras en células miocárdicas, la proliferación se detiene [92]. Esto fue demostrado mediante el mapeo tridimensional de la proliferación, el cual reveló que la tasa de proliferación de los cardiomiocitos en el pollo, ratón y humano es relativamente baja, comparada con la rápida división de los precursores cardiacos en el CDS en la pared dorsal del pericardio (Fig 3e', 3f', flechas) [93, 94, 78, 95], que entran al ciclo celular cada 5.2 horas aproximadamente [94]. Por tanto, la

diferenciación de los precursores cardíacos ocurre continuamente en el tejido que conecta el tubo cardíaco en desarrollo con el mesodermo esplácnico circundante.

Por otra parte, la agregación de células progenitoras en diferenciación al corazón también es paralela al crecimiento asimétrico del tubo cardíaco en proceso de expansión. Y esta agregación de células también participa en el movimiento de flexión a la derecha del corazón (Fig. 3c,d).

El mecanismo exacto por el cual se produce la flexión a la derecha del tubo cardíaco se desconoce. Parece estar íntimamente asociado con el desarrollo de la lateralidad en el embrión, la cual se establece durante la gastrulación y depende de una estructura rica en monocilios llamada nódulo primitivo o nódulo de Hensen [96]. Este nódulo se localiza en una región anterior y adyacente a la fosita primitiva (Figura 1.a).

El nódulo de Hensen se compone de células con estructuras ciliares llamadas monocilios que contienen 10 pares de microtúbulos, 9 periféricos y 1 par central, conectados por la proteína motora dineína para generar movimientos rotatorios [97]. La dirección de estos movimientos es determinada principalmente por los microtúbulos centrales, los cuales, establecen un flujo de líquido extracelular hacia la izquierda de los factores de crecimiento secretados y las moléculas de señalización.



Los eventos de señalización activan un patrón bilateral asimétrico de expresión de genes que determinan el eje izquierda-derecha (I-D) del embrión y de los órganos en desarrollo [97]. Nonaka y cols mostraron evidencia de este proceso, ellos observaron que los embriones de ratón en fase presomita bajo condiciones de flujo artificial a la derecha tuvieron una inversión de la flexión cardiaca (hacia la izquierda) y expresión del lado derecho de *Pitx2* y *Nodal*, los cuales son expresados normalmente en el lado izquierdo de la placa lateral del mesodermo [98]. Estos hallazgos sugieren que el flujo anormal altera la programación de genes I-D y afecta la dirección de la flexión cardiaca.

### 1.5.5 ANÁLISIS DE LOS LINAJES CELULARES DEL PRIMER Y SEGUNDO CAMPOS DEL DESARROLLO CARDIACOS.

La función de las células cardíacas progenitoras durante el desarrollo de las regiones que constituirán el corazón definitivo ha sido extensamente estudiada pero también es objeto de controversias [91]. Por ejemplo, se ha observado que existen diferencias en los perfiles de expresión de genes entre células del CDP y CDS [99], lo cual parece indicar que constituyen dos grupos celulares distintos, sin embargo también podría mostrar que fueron originadas desde un mismo grupo de células precursoras. Más aún, las células precursoras del seno venoso miocárdico se desarrollan a partir de un grupo de precursores negativos para *Nkx2-5* del CDS [100, 101], lo que demuestra la complejidad de los procesos que ocurren en los múltiples campos del desarrollo cardíaco.

El estudio del destino y función de las células cardíacas progenitoras se ha realizado mediante mapeo de células marcadas dentro de la región cardiogénica de la línea primitiva en embriones de pollo [102]. En comparación con los mamíferos, los embriones de aves ofrecen la ventaja de que los precursores cardíacos son más fáciles de manipular. Cui y cols revelaron que los precursores cardíacos en la región primaria bilateral del corazón cambian su posición relativa conforme ocurre la gastrulación en el mesodermo precardiaco aviar manipulado mediante electroporación de plásmidos [103]. Además, en dicho estudio se demostró que la migración de los precursores cardíacos ocurre por el

desplazamiento de grupos de células más que por procesos migratorios de células autónomas.

Los estudios en embriones de aves han sido importantes para nuestra comprensión del desarrollo temprano del corazón, pero no han sido suficientes para caracterizar toda la contribución de los precursores cardíacos en el corazón adulto. Por esta razón, se han desarrollado modelos de ratones transgénicos para buscar líneas celulares precursoras durante el desarrollo embrionario [104, 105]. Estos ratones transgénicos portan el gen *Cre* (del inglés “*Causes recombination event*”) que puede ser regulado por otro gen o secuencia, y el cual codifica para una enzima recombinasa de DNA que tiene acciones secuencia-específica y célula-específica. Cuando la enzima localiza un sitio específico como *loxP* (del inglés “*locus of X over P1*”), entonces cataliza un evento de recombinación específico entre dichos sitios. Como resultado de esta recombinación, el DNA entre estos sitios es cortado y degradado.

En otros ratones transgénicos es posible incorporar una secuencia que contiene codones de paro flanqueados por sitios *loxP* en la región promotora o río arriba de un gen reportero como *lacZ* o *GFP*. Si estos ratones son apareados con ratones portadores del gen *Cre* en líneas celulares específicas, los descendientes de esta cruce tendrán ambos *Cre* y *loxP* en dichas células. Por lo tanto, en estas células los codones de paro serán cortados y el gen reportero será expresado.

El análisis de líneas celulares *Cre-loxP* confirmó que *Mesp1* es uno de los marcadores más tempranos de las células progenitoras cardíacas [106]. Además con este análisis también demostró que la mayor parte del ventrículo derecho y el tronco arterial son modelados después de la formación del tubo cardíaco primitivo [107].

Aunque la adición progresiva de células precursoras al corazón ha quedado demostrada, el concepto de que estas células se originan desde múltiples campos del desarrollo cardíaco puede ser confuso. En este sentido, es posible que células precursoras similares genéticamente se segreguen tempranamente después de su formación [61], por lo que algunos precursores son diferenciados en células miocárdicas cuando el corazón adquiere la forma de tazón, mientras que otros se mantienen indiferenciados por más tiempo. Mau y cols observaron que *Nkx2-5<sup>Cre</sup>* y *Isl1<sup>Cre</sup>* son expresados en regiones sobrepuestas de la placa lateral del mesodermo [108] y que todas las células en el tubo cardíaco son *Nkx2-5* positivas [108], pero también son derivadas de un grupo precursor *Isl1*-positivo [109, 110]. Así mismo, un estudio reciente demostró que una subpoblación de células *Isl1*-positivas en el corazón también es derivada de células de la cresta neural [111].

Las células indiferenciadas del CDS se encuentran en la región dorsal y posterior del tubo cardíaco. Las señales pro diferenciación en los dos extremos del corazón,

guiarán la diferenciación de estos precursores en células miocárdicas. La población de células del CDS que contribuye de forma importante con células para el polo arterial se ha denominado CDS anterior, y las células son agregadas principalmente al polo venoso son referidas como el CDS posterior. El inicio de la diferenciación de las células del CDS anterior y posterior es retrasado de forma similar, pero estas células tienen diferentes marcadores moleculares. Esto sugiere que tienen diferentes programas genéticos necesarios para el inicio de la diferenciación y posiblemente para la trayectoria de la migración en orientación anterior o posterior.

### 1.5.6 DESARROLLO DE LAS CÁMARAS CARDÍACAS

El tubo cardíaco primitivo está formado por miocardiocitos de proliferación lenta [93, 94, 78, 95]. Estas células miocárdicas son conocidas como miocardio primario. Este tejido se caracteriza por tener escasa automaticidad, pobre contractilidad y velocidades de conducción lentas [46]. A medida que el tubo cardíaco continúa su desarrollo la curvatura externa inicia un proceso de diferenciación y proliferación localizadas cuyo fin será la expansión de las cámaras auricular y ventricular. Este proceso de expansión es parecido al inflado de un globo por lo que en el idioma inglés es llamado modelo de dilatación o “ballooning” de las cámaras cardíacas [38].

Las cámaras cardíacas están separadas físicamente por el canal auriculoventricular constituido por miocardio primario (Fig. 5). En etapas tempranas, la sangre drena desde el polo venoso hacia la aurícula común y viaja a través del canal auriculoventricular y el ventrículo embrionario hacia el tracto de salida. Cabe señalar que esta formación es similar a la observada en el corazón de los vertebrados inferiores [38, 112].

Durante las siguientes etapas, los miocardiocitos de las cámaras auricular y ventricular incrementarán sus velocidades de conducción, contractilidad y automaticidad, y desarrollarán estructuras sarcoméricas bien diferenciadas [46].

De tal manera que los miocardiocitos de las cámaras cardíacas alcanzarán el así llamado fenotipo miocárdico funcional.

## CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE LAS CÁMARAS CARDIACAS.

Houweling y cols demostraron que el gen *Nppa*, el cual codifica para el factor natriurético auricular, es uno de los marcadores más tempranos de la proliferación y expansión de las cámaras cardíacas [113]. Durante la morfogénesis de las cámaras cardíacas es necesaria la participación de diversos factores de transcripción, entre ellos: *Hand1*, *Irx4* y *Irx5*, *Nkx2-5*, *Gata4*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5* y *Tbx20*. Estos factores son conocidos por regular diferentes genes del desarrollo, por ejemplo *GJD4* y *GJA1* que codifican para las proteínas de uniones-gap, conexina 40 (Cx40) y conexina 43 (Cx43) [38, 46].

Algunos de estos factores de transcripción, incluyendo *Nkx2-5* y *Gata4*, están presentes en el asa cardíaca [109]. *Nkx2-5* es expresado en células del miocardio y en células cardíacas progenitoras, los embriones de ratón con deficiencia de *Nkx2-5* desarrollan un corazón tubular pero no inician la formación de la flexión cardíaca ni la formación de las cámaras. Por lo tanto, *Nkx2-5* es esencial para el desarrollo del tubo cardíaco y las cámaras, aunque redundante durante las etapas tempranas de la cardiogénesis.

La haploinsuficiencia de los genes que codifican a los factores de transcripción cardíaca Nkx2-5, Gata4 y Tbx5 puede causar defectos septales, mientras que la pérdida de la homocigocidad en alguno de estos genes puede ocasionar hipoplasia de las cámaras cardíacas en la fase de corazón tubular [85]. Estos factores son expresados tanto en el miocardio primario como en el miocardio funcional.

Por ejemplo, Tbx5 es predominantemente expresado en el mesodermo venoso precárdico, tracto de entrada, canal auriculoventricular y en el ventrículo embrionario y por tanto no es totalmente limitado al miocardio funcional. Los miembros de la familia Tbx20 son expresados a través del tubo cardíaco y los embriones de ratón deficientes para este gen muestran signos de arresto del desarrollo de las cámaras cardíacas. Por tanto, la regulación de la expresión de genes específica de las cámaras parece requerir de un grupo adicional de reguladores que son más específicamente expresados para confinar la morfogénesis de las cámaras a dominios localizados.

Los factores de transcripción cardíacos funcionan en paralelo como cofactores para complejos transcripcionales multiprotéicos que regulan la diferenciación localizada y la especificación de células miocárdicas primarias. *Nppa* nunca es expresado en el tubo cardíaco primitivo o en las células miocárdicas primarias de



las cámaras en formación, lo cual pudiera ser resultado de la activación de un programa genético específico o la represión de la formación de las cámaras en el miocardio primario. Interesantemente, otros dos miembros de la familia T-box, Tbx2 y Tbx3 son predominantemente expresados en las células del miocardio primario. El papel represivo de Tbx2 durante el desarrollo de las cámaras fue demostrado a través del análisis transgénicos, en los cuales una secuencia reguladora de 0.7-kb del gen *Nppa* fue clonada río arriba del gen reportero de  $\beta$ -galactosidasa *LacZ*, demostrando un patrón de expresión cámara específico similar al patrón endógeno de la expresión de *Nppa*. Este elemento genómico demostró reprimir la expresión de *LacZ* cuando se clonó río arriba de una secuencia reguladora que fue expresada en gran cantidad en el miocardio primario del canal auriculoventricular. La represión transcripcional observada en este estudio dependió de la acción coordinada de Nkx2-5 y Tbx2. Estudios adicionales han indicado que Tbx2 y Tbx3 reprimen individualmente la diferenciación del miocardio primario en miocardio funcional, pero también funcionan redundantemente para reprimir la morfogénesis e inducir la formación de los relieves endocárdicos.

Si Tbx2 y Tbx3 son reprimidos en las células de miocardio funcional y activadas en el miocardio primario esto fue evaluado en un reciente estudio, en el cual múltiples sitios de unión de tipo Smad fueron identificados dentro del canal auriculoventricular y tracto de salida específicos de potenciadores río arriba del sitio de inicio de la transcripción de Tbx2, permitiendo la activación mediada por

BMP de los genes en las células de miocardio primario. La expresión de Tbx2 en el tubo cardiaco primitivo es suprimida por Tbx20, el cual se une a Smad1 y Smad5, y además evita la formación los complejos de proteínas Smad que activan la expresión de Tbx2. Aunque la represión transcripcional de genes cámara específicos por Tbx2 y Tbx3 ha sido demostrada que recae sobre su capacidad de unión al DNA, estos represores también interactúan con desacetilasas de histona y deben regular la represión de las cámaras a través de la modificación de histonas también.

#### 1.5.7 DESARROLLO DEL MARCAPASO Y EL SISTEMA DE CONDUCCIÓN CARDÍACOS.

El corazón mamífero adulto propaga sangre en cada contracción rítmica, la cual presenta una contracción auricular seguida por un retraso en la contracción de los ventrículos. Los principales componentes que inician y propagan el potencial de acción necesario para la sincronización de las contracciones son las células del marcapaso cardíaco y del sistema de conducción. Excepto para las fibras de Purkinje, las características primarias de estos componentes son similares a aquellas encontradas en el miocardio primitivo embrionario, siendo ricas en glucógeno, con estructuras sarcoméricas pobremente desarrolladas y escasas mitocondrias. Además, en las cámaras del corazón en formación, un subgrupo de células miocárdicas primarias mantendrá su fenotipo embrionario para formar el futuro nodo sinusal, nodo auriculoventricular, el haz auriculoventricular y sus

ramas. A lo largo de estos años, los sistemas moleculares que promueven la diversificación de los precursores cardíacos en miocardio primario y funcional han recibido mucha atención y han indicado que una red de proteínas reguladoras es necesaria para la especificación del marcapaso y el tejido de conducción.

El nodo sinusal es el marcapaso dominante en el corazón y se origina de precursores Nkx2-5 negativos y Tbx18 positivos agregados al tubo cardíaco, formando el seno venoso. El nodo sinusal adulto expresa fuertemente *Hcn4* (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*), un canal de potasio implicado en la función de marcapaso. En el corazón embrionario, el todo el seno venoso expresa Hcn4 y puede iniciar el impulso eléctrico en su totalidad. Shox2, un factor de transcripción homeodominio, confina la región donde el primordio del nodo sinusal puede desarrollarse por represión de Nkx2-5, el cual impide la activación de Hcn4 y de Tbx3. Tbx3 es expresado en el nodo sinusal en desarrollo y no en el miocardio auricular circundante o el miocardio del seno venoso. En los precursores del nodo sinusal, Tbx3 inicialmente reprime la expresión de genes del miocardio funcional y posteriormente inicia el programa genético del marcapaso. El resto del seno venoso negativo para Tbx3 iniciará el programa genético para el miocardio funcional. El potente papel de Tbx3 para controlar el programa genético del nodo sinusal fue demostrado por la expresión ectópica de Tbx3 en la aurícula en desarrollo y en cardiomiocitos funcionales en el ratón, el cual indujo genes del marcapaso y funcionalidad, así como la reprogramación de su fenotipo miocárdico funcional original en células con

características semejantes a un nodo sinusal. En etapas tempranas del desarrollo del nodo sinusal, *Tbx18* especifica ambos las estructuras de la cabeza y cola del nodo sinusal de las células del mesénquima, pero no es necesario para los precursores de la cola del nodo sinusal.

La actividad de marcapaso es posteriormente propagada por el nodo auriculoventricular y el haz auriculoventricular. En el corazón embrionario, la sangre es empujada desde las cámaras auriculares hacia el canal auriculoventricular. Por tanto, durante este proceso, el canal auriculoventricular *Tbx2/Tbx3*-positivos pero *Cx40* y *Nppa* negativos retrasan la propagación del impulso de forma análoga a la del nodo auriculoventricular adulto. En este sentido con su papel temprano, los perfiles de expresión génica comparativos del canal auriculoventricular y el nodo auriculoventricular fetal revelan semejanzas en sus programas genéticos, indicando que el programa genético canal específico es mantenido en el nodo auriculoventricular.

En el corazón embrionario, la activación ventricular sigue una trayectoria que inicia desde la parte dorsal del canal auriculoventricular negativo para *Cx40* y corre a través del miocardio trabecular en desarrollo positivo para *Cx40*. En etapas posteriores, el haz auriculoventricular, sus ramas y fibras de Purkinje comienzan a expresar *Cx40*. La especificación del haz auriculoventricular ocurre a través de una red de factores de transcripción que incluyen a *Tbx5*, *Nkx2-5*, *Id2*, *Irx3* y *Tbx3*.

*Tbx3* reprime el programa genético del miocardio funcional en el haz auriculoventricular en desarrollo, pero algunos genes son necesarios para la rapidez de la conducción, incluyendo Cx40, el cual gradualmente será activado en estas células en etapas fetales posteriores, a pesar de la presencia de *Tbx3*. Este hallazgo indica que el tejido de conducción desarrollado depende de programas genéticos temporalmente reprimidos y posteriormente activados. Más aún, ambos *Tbx3* y *Tbx5* regulan aspectos funcionales del sistema de conducción a través de la unión a sitios potenciadores de genes *Scn5a* y *Scn10a* que codifican para canales de sodio y que son conocidos por ser vitales para la excitabilidad cardíaca. Recientemente, la vía de señalización Notch fue mostrada que promueve la expresión de genes específicos del sistema de conducción en cardiomiocitos neonatales, reprogramándolos en células con características electrofisiológicas de células del sistema de conducción. Todo este intricado proceso molecular es crucial para determinar la forma y función del sistema de conducción de las cuatro cámaras del corazón.

### 1.5.8 FORMACIÓN DE LOS SEPTUMS CARDÍACOS

Los principales septums del corazón se forman entre los días 27 y 37 del desarrollo, cuando el embrión crece en longitud de 5 mm a aproximadamente 16 a 17 mm. Es posible que la formación de estas divisiones ocurra de dos formas: la primera, por el crecimiento de dos masas de tejido que se van aproximando hasta fusionarse o la segunda, por el crecimiento de una sola masa de tejido que alcanza el lado opuesto de la luz.

Las masas de tejido, conocidas como almohadillas endocárdicas se desarrollan en las regiones auriculoventricular y conotruncal. Estas almohadillas endocárdicas, participan en la formación de los septums auricular y ventricular (porción membranosa), el canal auriculoventricular y las válvulas auriculoventriculares y los canales aórtico y pulmonar. Por su localización, las anomalías en la formación de estos tejidos pueden dar origen a defectos septales, transposición de los grandes vasos, tronco arterioso común y tetralogía de Fallot.

### 1.5.9 DESARROLLO DEL POLO ARTERIAL DEL CORAZÓN

La evidencia acumulada indica que las alteraciones en el desarrollo de CDS producen un amplio espectro de cardiopatías que incluyen defectos conotruncales, ventriculares, septales auriculares y septales auriculoventriculares.

El polo arterial es el componente primario afectado en aproximadamente 1/3 de todas las cardiopatías congénitas. En el corazón en desarrollo, el polo arterial o craneal comprende el tracto de salida, el saco aórtico, y las arterias del arco faríngeo. En el corazón adulto, el polo arterial inicia desde la base del miocardio y las células del músculo liso de la aorta y la unión con el tronco pulmonar. Por tanto, el polo arterial de embrión se remodela de tal manera que la pared de musculo liso de la aorta ascendente y el tronco de la pulmonar se unen directamente al miocardio de los grandes vasos.

Durante esta transición, los relieves cardiacos del mesénquima en el lumen del tracto de salida se desarrollarán en válvulas semilunares para evitar la regurgitación de sangre. Interesantemente las células primarias del miocardio y el relieve del mesénquima hacen que el tracto de salida cardíaco funcione como un esfínter con características de válvula, basado en sus propiedades primitivas y la pobre conducción de los cardiomiocitos del tracto de salida comparado con el miocardio funcional. Además, en las cámaras cardíacas en formación existe una

aparente separación de la trayectoria de la sangre cuando viaja desde ambas aurículas hacia el tracto de salida. Las alteraciones del desarrollo del CDS y el tracto de salida del miocardio han demostrado que afectan la morfogénesis de las válvulas cardíacas. Por tanto, para el desarrollo del polo arterial son necesarias múltiples poblaciones celulares, enfatizando la importancia de mecanismos moleculares desconocidos que controlan el desarrollo del corazón.

#### 1.5.10 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL SEGUNDO CAMPO DEL DESARROLLO CARDÍACO

La elongación del tubo cardíaco requiere que los precursores del CDS se mantengan como células indiferenciadas, pero también continúen estando presente en número significativo para rellenar las células del CDS que ha iniciado un programa genético miocárdico y ha sido agregado al polo arterial. Estas características del desarrollo son mantenidas por la expresión de genes que suprimen la diferenciación y promueven la proliferación, los cuales han recibido considerable atención en los últimos 10 años. Las vías de señalización necesarias para inducir la diferenciación y mantener las poblaciones celulares en el embrión en desarrollo incluyen ligandos intercelulares y receptores de FGF, BMP, Hh, Notch, ácido retinoico (AR) y vías de señalización Wnt.

##### 1.5.10.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT



Las vías canónicas y no canónicas de Wnt tienen funciones muy importantes durante la cardiogénesis temprana, tanto inducción como inhibición de la diferenciación cardiomiogénica [74, 114-117]. La vía de señalización Wnt inicia con la unión de ligandos Wnt extracelulares al complejo receptor Frizzled-LRP5/6. Esto estimula la activación de Dishevelled intracelular, la cual estabiliza  $\beta$ -Catenina citoplásmica que entonces se transporta al núcleo, para unirse a TCF/LEF e inducir la transcripción de genes de blanco [118].

La vía de señalización no canónica de Wnt funciona río abajo del Dishevelled activado, la cual activa a las proteínas G, Rac y Rho, y a las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la asociada a Rho (ROCK), las cuales activarán la transcripción de genes a través del complejo ATF/CREB [119].

La sobreexpresión de Wnt3a y Wnt8 producen la inhibición de la diferenciación cardiomiogénica, indicando que la señalización canónica Wnt también debe ser antagonizada [68]. Esto sucede a través de Dkk1 y Crescent, los cuales activan la transcripción de Nkx2-5, Tbx5 y otros genes que codifican para proteínas estructurales del músculo. Además, la atenuación de la señalización Wnt es fundamental para que suceda la inducción de la diferenciación cardiogénica a través de BMP [67].

Posterior a la inducción de la diferenciación cardíaca y la formación del tubo cardíaco, la ablación de  $\beta$ -catenina en el CDS [115] o en los descendientes *Mesp1* [120] disminuye el número de células cardíacas precursoras positivas para *Isl1*. En cambio, cuando  $\beta$ -catenina es activada constitutivamente en el CDS, la expresión de *Isl1* se incrementa, subrayando la importancia del equilibrio entre la dosis de Wnt/ $\beta$ -catenina durante la diferenciación de las células progenitoras cardíacas.

Por otra parte, las proteínas Wnt5a y Wnt11 actúan a través de la vía no canónica Wnt para limitar la acción represiva de la señalización canónica Wnt en las células progenitoras del CDS [68, 65, 121, 122, 119, 123]. Por lo tanto, la vía canónica Wnt inhibe la diferenciación cardíaca y mantiene multipotencia celular, mientras que la vía no canónica promueve la diferenciación a través de la inhibición de la señalización canónica, lo cual es crítico en las siguientes etapas del desarrollo.

#### 1.5.10.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN *FGF*.

La vía de señalización *FGF* es uno de los blancos de la señalización Wnt en el CDS y por lo tanto tiene importantes implicaciones para el crecimiento y desarrollo de células progenitoras. La expresión de *Fgf8* en el endodermo anterior es muy importante durante la diferenciación temprana del mesodermo cardiogénico [64]. La pérdida de la expresión de *Fgf8* anula la proliferación del CDS, la sobrevivencia y la elongación del tubo cardíaco [124, 125].

Además, *Fgf8*, *Fgf10* y el receptor *Fgfr1*, son necesarios durante la flexión cardíaca [126, 127, 125]. La disminución de la expresión de *Fgf8* en el endodermo faríngeo y en las células del CDS produce defectos del arco aórtico, acortamiento del tracto de salida y alteraciones del alineamiento ventrículo-arterial [128, 129]. La expresión del ligando FGF durante la migración del CDS también es afectada por la deficiencia de *Tbx1* [130, 126, 127] y de *Isl1* [131]. Además, tanto en el modelo de ratón con expresión deficiente de *Fgfr1* y *Fgfr2*, y sobreexpresión de *Sprouty2* (proteína inhibidora de Fgf); como en el modelo de ratón deficiente de *Frs2α* (mediador de la función receptora de Fgf), se observaron acortamientos en el tracto de salida y defectos en la diferenciación miocárdica [125, 132].

Por lo tanto, los ligandos de FGF actúan durante el desarrollo del tracto de salida. Esto también es demostrado en el ratón que porta una mutación en *Fgfr2-IIIb* el receptor principal de *Fgf10* el cual presenta defectos del tracto de salida (CIV, cabalgamiento de aorta y doble salida del VD) más graves que el ratón con delección de *Fgf10* [133]. El mecanismo por el cual los ligandos FGF causan la migración de las células del CDS hacia el tracto de salida no es claro, pero se cree que pueden haber otros factores de crecimiento adicionales controlados por la superfamilia de *Tgfβ* [134], los cuales mantienen el equilibrio necesario para los procesos de migración, proliferación y diferenciación del CDS.

### 1.5.10.3 SEÑALIZACIÓN TGFB.

La superfamilia de proteínas Tgf $\beta$  es responsable de la señalización en las células progenitoras cardíacas a través de ligandos como BMP, uno de los efectores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Las proteínas BMP participan en los procesos de especificación y diferenciación de las células progenitoras. Son antagonistas de la señalización de FGF. El exceso de BMPs cambia el fenotipo del mesodermo no cardiogénico por el fenotipo cardíaco.

Las BMPs se ligan y activan a los receptores de BMP de tipos 1 y 2, los cuales fosforilan proteínas Smad1/5/8, asociadas al coactivador Smad4, y posteriormente activan la transcripción de genes blanco. La señalización de Bmp es inhibida por Smad 6 y 7, las cuales afectan el desarrollo de las células progenitoras cardíacas.

Bmp2, un miembro importante de la familia BMP, controla la especificación temprana del mesodermo cardiogénico y es necesaria para la diferenciación del tracto de salida distal, probablemente a través de la agregación de células del CDS, indicando así una función crítica durante la elongación del tracto de salida.

Otros ligandos de BMP encontrados durante el desarrollo del tracto de salida enfatizan la complejidad de su función en el desarrollo. Por ejemplo, la delección de Bmp4 en el ratón afecta la septación del tracto de salida, el desarrollo de músculo liso y la formación de las almohadillas endocárdicas y el homocigoto compuesto

para mutaciones en *Bmp4* y *Bmp7* altera gravemente la elongación del tracto de salida [135].

La expresión de *Bmp4* también se reduce en el ratón con deficiencia de otros factores de transcripción importantes, como: *Isl1*, *Tbx2*, *Tbx3* o la proteína *Smarcd3* [131, 136]. La ausencia del receptor *Bmpr1* induce a las proteínas BMPs en las células progenitoras cardíacas, pero en las células del CDS o en las células de la cresta neural causa defectos en la septación del tracto de salida o en el proceso de elongación.

La señalización de BMP también regula la diferenciación a través de la inducción del micro RNA 17-92, el cual inhibe a *Isl1* y *Tbx1*. Sin embargo, la deficiencia de *Isl1* disminuye también la expresión de ligandos de BMP. La importancia de las BMPs en los precursores cardíacos fue demostrada en ratones mutantes nulos para *Nkx2-5*, en los cuales *Bmp2* está sobre regulada, dando lugar a defectos por sobrespecificación y proliferación en las células progenitoras cardíacas [109].

#### 1.5.10.4 VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG Hh

La unión del ligando Hedgehog (Hh) a su receptor transmembrana Patched (Ptc) libera la inhibición de éste sobre la proteína Smoothened (Smo), lo cual inicia la

cascada de señalización. Posteriormente esto dará lugar a la conversión de factores de transcripción Gli en activadores transcripcionales.

En 2001, Garg y cols demostraron que sonic hedgehog (Shh), un factor clave en la señalización Hh, regula a Tbx1 a través de la activación de factores de transcripción forkhead (Fox) [137]. De esta forma, Shh participa en los procesos de crecimiento del CDS y es importante durante la septación del tracto de salida y desarrollo posterior del CDS a través de Tbx5. Además, la ausencia de Shh causa un fenotipo muy semejante al ocasionado por la deficiencia de Tbx1 en embriones de ratón [138].

Así mismo, la alteración del receptor Smoothened (Smo) produce defectos graves en la elongación del tubo cardíaco, similar a lo que ocurre en embriones de ratón nulos para Shh e Indian hedgehog (Ihh). La proteína Smo se expresa en células del CDS y su delección condicional causa el desarrollo de graves defectos en la elongación del tracto de salida y un tronco arterial común. Por lo tanto, la vía de señalización Hh es necesaria en las células del CDS para alcanzar la migración y desarrollo adecuados.

#### 1.5.10.5 VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

La vía de señalización Notch comienza con la unión de los ligandos Serrate, Delta y Jagged al receptor transmembrana adyacente Notch. El sitio proteolítico de este receptor activa la liberación del dominio intracelular Notch (NICD) dentro del citoplasma, el cual se transporta al núcleo para activar genes blanco [139].

En los ratones con ausencia de Notch1, se observa el desarrollo del tubo cardíaco, sin embargo, la diferenciación de las células progenitoras se altera provocando su muerte entre los días 9.5 y 10.5 [140]. Por lo tanto, los procesos de crecimiento y proliferación de las células precursoras cardíacas dependen de la activación de  $\beta$ -catenina a través de la señalización Notch [141].

Por otra parte, High y cols demostraron que la delección condicional de la vía de señalización Notch en células *Isl1* o *Mef2c* positivas causa graves malformaciones del tracto de salida y afecta el sistema el desarrollo del arco aórtico [142]. De la misma manera, Klaus y cols demostraron que la activación secuencial de las vías de señalización: Notch, Wnt/ $\beta$ -catenina y BMP, son necesarias para la diferenciación de las células progenitoras cardíacas [143].

#### 1.5.10.6 SEÑALIZACIÓN DE ÁCIDO RETINOICO

El ácido retinoico (AR) es la forma activa de la vitamina A y un regulador principal de muchos procesos del desarrollo y en especial durante la cardiogénesis. La mayor fuente de AR en el embrión se obtiene del retinol materno (transferido a través de la placenta). El AR debe unirse a complejos de receptores nucleares específicos RARs (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ ) / RXR (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  y RXR $\gamma$ ) para ejercer su función. Los genes blanco del AR incluyen, entre otros, a los miembros de la familia *Hox*: *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxb4* and *Hoxd4*.

La enzima retinaldehído deshidrogenasa 2 (*Raldh2*), codificada por el gen *ALDH1A* en humanos, cataliza la oxidación de retinaldehído a AR. Si esta enzima pierde su función se produce una deficiencia grave de AR. Por tanto, esta enzima tiene una función importante en la regulación de las concentraciones del AR. Además, durante el desarrollo se expresa en la línea primitiva, células del mesodermo faríngeo, posterior al tubo cardíaco y en el prosencéfalo en desarrollo [\[144\]](#).

La concentración y distribución del AR deben ser estrechamente reguladas durante la embriogénesis [\[145-147\]](#). Además de *Raldh2*, las enzimas del citocromo P450 subfamilia 26 (CYP26A1, CYP26B1 Y CYP26C1) también son importantes reguladores de la concentración de AR. La función principal de las enzimas del citocromo es transformar el AR en metabolitos más polares para ser



degradados. Este sistema ha demostrado ser importante para evitar la señalización inadecuada en grupos celulares específicos.

El ratón nulo para *Raldh2*<sup>-/-</sup> muere como consecuencia de los defectos cardíacos en los cuales se afecta el proceso de flexión del corazón y el desarrollo auricular. Además, en estos ratones se altera la expresión de genes en las células del CDS, como: *Tbx1*, *Fgf8* y *Isl1* [148].

Roberts y cols demostraron que la ausencia de *Tbx1* modifica la expresión de los tres genes *Cyp26* en el mesodermo faríngeo. Además, observaron que si se bloquea la función de *Cyp26* en embriones de pollo se produce un fenotipo similar al observado en los casos con síndrome por microdelección 22q11.2. Por lo tanto, el fenotipo de estos embriones podría ser consecuencia tanto del exceso de AR local como de la alteración en la regulación de genes, como *Tbx1* o *Raldh2* entre otros [149-152].

#### 1.5.11 CARACTERÍSTICAS Y DESARROLLO DEL SEGUNDO CAMPO DEL DESARROLLO CARDÍACO

El campo de desarrollo secundario (CDS) se refiere a un grupo de células precursoras del corazón que cubren el tubo cardíaco y participan en el desarrollo de los polos arteriales y venosos del corazón. Las estructuras originadas de las

células del CDS son: El ventrículo derecho, parte del septum ventricular, el miocardio y las células del músculo liso de las salidas arteriales y la aurícula. El factor de transcripción Isl1 es un marcador de las células del CDS.

Fgf8 y Bmp2 inducen la diferenciación en el CDS, en el tracto de salida y endodermo lateral. Los efectores más importantes de estos factores son Tbx1, Isl1 y Fgf10.

Isl1 es importante para la migración de las células y el desarrollo del tracto de salida. Tbx1 induce la proliferación y reduce en parte, la diferenciación celular.

Es esencial que las células del CDS migren correctamente y a un ritmo controlado. Para ello, las células tendrán que mantenerse indiferenciadas (señalización BMP) y controlar su proliferación (señalización FGF). Los FGFs (Fgf8, Fgf3 y Fgf10) son expresados en el mesodermo faríngeo y epitelio, y tienen interacción con las vías de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina y Jagged/Notch.

#### 1.5.12 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN T-BOX Y EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS CARDÍACAS

Los factores de transcripción de la familia T-box son fundamentales para el desarrollo embrionario. En el corazón de los vertebrados se expresan 6 de los 17 diferentes factores T-box conocidos [153]. Estos factores son necesarios para el crecimiento, desarrollo y diferenciación de las células del miocardio [154, 155]. Además, poseen elementos de unión al DNA altamente conservados que les permiten activar o reprimir la transcripción de genes blanco, así como interactuar con otros factores en la remodelación de la cromatina [156, 157].

En el tubo cardíaco, la agregación continua de células *Tbx5* positivas al polo venoso contribuye a la formación de la pared del ventrículo izquierdo, las cámaras auriculares y el septum auricular. Por lo tanto, estos componentes cardíacos son derivados del CDS [45]. La expresión de *Tbx5* gradualmente disminuye desde el tracto de entrada hasta el ventrículo derecho, mientras que el tracto de salida es negativo para la expresión de *Tbx5* [158]. Sin embargo, no es claro si el tracto de salida proviene de un grupo precursor de células negativas para *Tbx5*.

Por otra parte, la expresión ectópica de *Tbx5* en todos los cardiomiocitos produce defectos en la flexión del corazón y un corazón embrionario que retiene una apariencia de ventrículo izquierdo [159]. Por el contrario, la ausencia de *Tbx5* afecta la participación del CDS posterior, el crecimiento y la expresión de genes cardíacos en el corazón tubular, lo que indica que tanto el corazón tubular y como el CDS dependen de *Tbx5* para su apropiado crecimiento [158].

De forma similar a Tbx5, el transcrito de Tbx20 puede ser encontrado en ambos el primer y segundo campos del desarrollo cardíacos, pero a diferencia de Tbx5, el Tbx20 si es expresado en todas las células del miocardio y endocardio. La alteración en los niveles de expresión de Tbx20 ha sido asociada con Tetralogía de Fallot [160, 161], enfermedad valvular, cardiomiopatía [162, 161] y con alteraciones en la homeostasis cardíaca [163].

Los embriones de ratón con expresión deficiente de Tbx20 desarrollan un corazón tubular de forma normal, sin embargo, el proceso de elongación se detiene. Lo cual sugiere que la pérdida de Tbx20 en precursores cardíacos y cardiomiocitos afecta al proceso de flexión del corazón y la morfogénesis de las cámaras cardíacas. Además, en estos ratones hay evidencia de una disminución en la expresión de genes específicos para las cámaras cardíacas como *Nppa*, *Chisel* y *Irx4* [164-167]. El ratón knockdown para *Tbx20* presenta hipoplasia del tracto de salida y del ventrículo derecho. Tbx20 activa a *Mef2c* en el CDS anterior [167] e inhibe al *Isl1* miocárdico [164], lo cual demuestra que Tbx20 es importante tanto para la dispersión y como para el desarrollo del CDS.

Tbx2 es un represor transcripcional que se expresa en el CDS y en células de la cresta neural adyacente, en células del miocardio del tracto de salida, en la curvatura interna, el canal auriculoventricular, y en etapas tempranas, en parte del

tracto de entrada [168, 169, 107]. La expresión ectópica de Tbx2 en todo el corazón produce defectos de elongación del tracto de salida, lo que podría ser causado por la regulación a la baja de las moléculas de adhesión Alcam y N-caderina en el tracto de salida del corazón, afectando la migración y dispersión del CDS. Es interesante que en estos corazones dismórficos con alteración en la expresión de Tbx2, Tbx20 mostró una disminución específica en el tracto de salida [170], mientras que en el ratón mutante para Tbx20, Tbx2 fue expresado ectópicamente en el tubo cardíaco y el asa cardíaca, manteniendo un fenotipo miocárdico primitivo [165]. Los resultados sugieren que Tbx20 inhibe directamente a Tbx2, pero en el homocigoto compuesto para Tbx20 y Tbx2 no cambiaba el fenotipo del corazón embrionario primitivo en los mutantes para *Tbx2* [171]. Los análisis adicionales revelaron que la regulación de Tbx20 por Tbx2 se realiza a través de la vía de señalización de Bmp/Smad. En esta vía de señalización Tbx20 forma un complejo con Smad1 y Smad5 desplazando a Smad4, lo que impide la transcripción de Tbx2 [172].

Tbx2 comparte homología estructural y funcional con su parálogo más cercano Tbx3 y ambos factores se sobreponen en múltiples regiones del desarrollo del embrión [173-175, 168, 136]. El Tbx3 se expresa en células que formaran el canal auriculoventricular, el nodo sinusal y en etapas posteriores, al componente central del sistema de conducción [176-178, 169, 136]. Por el contrario Tbx3, no es expresado en las células de las cámaras cardíacas.

La expresión de *Tbx3* también es observada en el epitelio faríngeo, células de la cresta neural y un subdominio del CDS [169, 136]. La ausencia de *Tbx3* en el ratón afecta las vías de señalización en el CDS y tracto de salida, lo cual altera el proceso de la elongación del tracto de salida y produce una doble salida del ventrículo derecho [178, 169]. Además, debido a que *Tbx3* se expresa predominantemente en células derivadas de la cresta neural, los resultados indican que estas células también son importantes durante la extensión del tubo cardíaco. Estos hallazgos concuerdan con lo observado en embriones de pollo cuando se les realiza la ablación de células de la cresta neural, en quienes también se altera el proceso de flexión cardíaca y elongación del tracto de salida [179]. De esta manera, es claro que existe una interacción muy importante entre las vías de señalización de las células derivadas de la cresta neural y el CDS.

*Tbx2* y *Tbx3* comparten genes blanco que se encuentran localizados en regiones faríngeas y cardíacas sobrepuestas, por lo tanto estos factores de transcripción podrían actuar de forma redundante en sentido funcional. Para apoyar este supuesto, se ha demostrado que en el ratón la pérdida de tres de los cuatro alelos de *Tbx2* y *Tbx3* (*Tbx2*<sup>+/-</sup>; *Tbx3*<sup>-/-</sup> y *Tbx2*<sup>-/-</sup>; *Tbx3*<sup>+/-</sup>) causa en ambos casos una hipoplasia del ventrículo derecho y del tracto de salida, anomalías de los relieves endocárdicos y del desarrollo auriculoventricular [136, 180]. Mesbah y cols [136] también demostraron que estos genes son necesarios río arriba de *BMP*-, *FGF*- y la vía de señalización Hh en el CDS y el endodermo faríngeo, afectando la señalización intracelular durante el desarrollo del tracto de salida.

Adicional a la función de Tbx2 y Tbx3 durante la morfogénesis cardíaca, Tbx1 también participa en la regulación del desarrollo en el tracto de salida [136]. Tbx1 es conocido por ser un candidato mayor en la etiología del fenotipo del síndrome por microdelección 22q11.2, el cual es caracterizado por un amplio espectro de características entre las que se incluyen defectos craneofaciales y del arco aórtico [181, 182]. La expresión de Tbx1 es casi exclusiva del CDS, endodermo faríngeo y mesénquima de la cabeza [136]. Los estudios de linajes genéticos en el ratón demostraron que células Tbx1-positivas contribuyen al desarrollo del tracto de salida del miocardio, ventrículo derecho, endocardio y relieves del mesénquima desde el día E8.25 en adelante [183, 127, 184].

Tbx1 es conocido por tener una función preponderante sobre el control del equilibrio entre la proliferación y diferenciación en el CDS [185]. La ausencia de Tbx1 afecta el desarrollo del CDS produciendo hipoplasia del tracto de salida distal a mitad de la gestación y, en etapas fetales, un tronco arterial común [127, 186]. Así mismo, el número de células de la cresta neural en la región faríngea es afectado por la pérdida de Tbx1, lo cual afectaría el número de células del CDS y posiblemente la septación del tracto de salida [187, 136].

El desarrollo de las células progenitoras cardíacas también depende de Tbx1, el cual regula Wnt5a por medio de Baf60a e inhibe Mef2c, afectando por tanto a la

diferenciación y a la activación de genes blanco [188, 189]. Aunque se sabe poco sobre los reguladores río arriba de *Tbx1*, algunos estudios han indicado que *Shh* podría activar a *Tbx1* [190], mediante la inducción de factores de transcripción *Fox* tales como *Foxa2*, *Foxc1* y *Foxc2*, los cuales actuarían sobre el promotor de *Tbx1*. Sin embargo, *Tbx1* parece mantener su propia expresión actuando sobre *Foxa2* a través de un mecanismo autoregulatorio de retroalimentación [126]. Por su parte Zhang & Baldini [191], demostraron que en ratones transgénicos la remoción o mutación del sitio de unión a *Fox* en el elemento de respuesta *Shh* de *Tbx1* no afecta el desarrollo del corazón in vivo. Sumado a las proteínas *Shh* y *Fox*, la actividad de *Tbx1* también depende de *Ripply3* en el epitelio faríngeo [192].

En los embriones de ratón heterocigotos compuestos para *Tbx2* y *Tbx3*, *Tbx1* es expresado de forma ectópica en las células del endodermo adyacente al CDS. Sin embargo, *Tbx1* demostró ser necesario para la expresión de *Tbx2* y *Tbx3* en el mesénquima faríngeo y derivado de la cresta neural, aunque este efecto resulta de la alteración de señalización intracelular entre el mesodermo faríngeo, el epitelio y las células de la cresta neural puesto que *Tbx1* no se expresa en la cresta neural.

Además, la expresión de los genes *Tbx2*, *Tbx3*, *Isl1*, *Fgf8* y *Fgf10* disminuyó en las células del pericardio dorsal donde se ubican las células del CDS, lo que sugiere que *Tbx1* también actúa río arriba de estas proteínas clave para el desarrollo del CDS [90, 136]. Cabe señalar que los embriones deficientes de



Tbx1, Tbx2 o Tbx3 presentan fenotipos graves en el desarrollo de la faringe y la elongación del tubo cardíaco, lo cual indica la existencia de una regulación cruzada entre Tbx1/Tbx2/Tbx3 durante el desarrollo del tracto de salida y el CDS [\[136\]](#).

Además, la función de Tbx2 y Tbx3 es ayudar de forma redundante a Tbx1 tanto en la regulación de la proliferación, como en la inhibición de la diferenciación en las células progenitoras cardíacas localizadas en el CDS. Tbx1 también realiza interacciones genéticas y moleculares con otros genes como Crkl, Fgf8, Pitx2, Gbx2, Chd7, Six1/Eya1 [\[193, 150, 194-198\]](#), los cuales podrían ser genes modificadores de la gravedad del fenotipo para las alteraciones cardiofaríngeas en pacientes con el síndrome por microdelección 22q11.2.

### 1.5.13 IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL PARA EL DESARROLLO Y MIGRACIÓN DEL CAMPO DE DESARROLLO CARDIOGÉNICO SECUNDARIO (CDS)

Las células de la cresta neural constituyen un grupo de precursores que son indispensables para la transformación del tracto de salida miocárdico en la aorta y el tronco pulmonar. Estas células multipotentes migran durante la embriogénesis temprana, se desplazan en finas capas desde el margen lateral de la placa neural de forma rostro-caudal y dan lugar a diferentes líneas celulares, tales como:

células del sistema nervioso central, células del músculo liso, cartílago craneofacial, neuronas, glia y melanocitos [[199](#), [200](#)].

De acuerdo a su localización, las células de la cresta neural se pueden dividir en cuatro dominios funcionales: La cresta neural craneal, troncal, vago-sacral y cardíaca. Esta última es una subregión de la cresta neural craneal que migra hacia el tracto de salida. En el embrión de ratón en desarrollo, el análisis de líneas celulares usando ratones Wnt1-Cre y reporteros transgénicos Rosa26 demostraron que las células de la cresta neural invaden las almohadillas del tracto de salida proximal y distal y ayudaron a la formación de las valvas semilunares, la túnica media de la pared del músculo liso de los grandes vasos, el arco aórtico y las carótidas proximales [[201-203](#)].

Así mismo las células de la cresta neural también mostraron una moderada contribución para las células del músculo liso de las arterias coronarias proximales y las ramas intermedias [[201](#)]. Por tanto, estas células son muy importantes para el desarrollo y la septación del tracto de salida en los vasos pulmonares y sistémicos [[204](#)]. Además, las células de la cresta neural también participan en la formación del timo, glándulas tiroideas y paratiroides, las cuales se desarrollan de las bolsas endodérmicas faríngeas.

Las células de la cresta neural cardíaca se originan de los pliegues neurales, desde la placoda auditiva hasta el tercer somita y migran hacia dentro del tercer, cuarto y sexto arcos faríngeos [205-207]. Posteriormente, migran hacia la pared dorsal de pericardio, desde donde ingresan al tracto de salida.

La importancia de células de la cresta neural cardíaca durante la septación fue demostrada en experimentos realizados en embriones de pollo con ablación de estas células lo cual impidió la formación de septum aórtico-pulmonar dando como resultado la formación de un tronco arterioso persistente [205-207].

En estos embriones se altera la migración del CDS hacia el tracto de salida produciendo un desarrollo anormal del asa cardíaca y un acortamiento del tracto de salida, mientras que las células del músculo liso se desarrollan de forma normal [179]. Estos hallazgos ilustran la función obligatoria de las células de la cresta neural cardíaca y su migración al corazón, donde realizan el control de la migración de los precursores miocárdicos del tracto de salida.

Cuando las células de la cresta neural migran a los arcos faríngeos, rodean y se entremezclan con los núcleos mesodérmicos dentro de los arcos que contienen la mayor parte de los precursores de los músculos craneofaciales. Estos arcos faríngeos son limitados por epitelio faríngeo y como consecuencia, estas células de la cresta neural también podrían tener interacción con éstas y otras células del

mesodermo faríngeo. Como evidencia de lo anterior, Hutson y cols observaron niveles elevados de Fgf8 en el endodermo caudal faríngeo de embriones de ratón con ablación de células de la cresta neural [208]. Los embriones de ratón con deficiencia de Tbx1 mostraron una migración interrumpida de la cresta neural, solo para el primer arco faríngeo y las células de la cresta neural que deberían migrar a los arcos más caudales son redirigidas hacia el primer arco. Tbx1 es expresado predominantemente en el endodermo faríngeo y mesodermo incluyendo CDS, pero no en las células de la cresta neural, sugiriendo una función de Tbx1 independientemente de la célula durante la migración de la cresta neural cardíaca.

## 1.6 FACTORES DE RIESGO NO GENÉTICOS PARA CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

Diversos factores de susceptibilidad han sido estudiados como factores de riesgo para cardiopatías congénitas. De manera general, estos factores pueden ser divididos en cuatro categorías: (1) Condiciones o características de los progenitores, (2) exposiciones maternas a medicamentos terapéuticos, (3) exposiciones a drogas y (4) exposiciones a contaminantes ambientales.

### 1.6.1 CONDICIONES O CARACTERÍSTICAS DE LOS PROGENITORES

EDAD MATERNA (EM): Tanto la EM avanzada como joven han sido asociadas con CC [\[209-214\]](#). El riesgo de CC se incrementa en 20% en mujeres de  $\geq 35$  años para cardiopatías específicas como: defectos de lateralidad, conotruncales, obstrucciones del tracto de salida del ventrículo izquierdo y derecho y defectos septales [\[214\]](#). Gill y cols observaron un incremento en el riesgo para TF en  $\geq 40$  años con una RM ajustada<sup>4</sup> de 2.2 (IC95% 1.4-3.3). Otras cardiopatías que también mostraron asociación en esta edad fueron: Defecto septal ventricular perimembranoso (RM 2.5 (IC95%1.8-3.5), defecto septal auricular (RM 2.5 (IC95%1.5-4.1) y la asociación de defecto septal ventricular más defecto septal auricular RM 2.9 (IC95%1.8-4.7) [\[215\]](#).

---

<sup>4</sup> Razón de Momios ajustada por etnicidad/raza maternas, educación, índice de masa corporal, uso de ácido fólico, tabaquismo, gravidez y diferencia en la edad de los progenitores.

DIABETES MELLITUS (DM): La diabetes materna pregestacional ha mostrado ser un factor de riesgo consistente en distintos estudios [\[216-219\]](#). La DM pregestacional parece inducir malformaciones antes de la séptima semana de gestación, periodo crítico para la organogénesis [\[220\]](#). Los tipos de CC asociados con la DM incluyen defectos septales atrioventriculares, doble salida del ventrículo derecho, atresia pulmonar, retorno venoso anómalo pulmonar, Tetralogía de Fallot y tronco arterioso [\[217, 219\]](#). Correa y cols mostraron que para TF aislada la DM pregestacional (RM 4.89 (2.18-10.95)) y gestacional (RM 1.12-2.87) incrementan el riesgo de ocurrencia del defecto.

INFERTILIDAD / TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: Las mujeres con historia de infertilidad y uso de técnicas de reproducción asistida tiene mayor riesgo de tener un hijo con algún tipo de cardiopatía [\[221\]](#). Las CC que han mostrado una asociación consistente con este factor de riesgo son: Defectos septales auriculares y ventriculares, estenosis de la válvula aortica y tetralogía de Fallot [\[222, 223, 221\]](#).

PARIDAD: Aunque las mujeres multíparas han mostrado un mayor riesgo de tener hijos con CC [\[210, 224\]](#), las mujeres quienes no tienen un embarazos previos también tienen mayor riesgo para CC [\[225, 224\]](#). Duong y cols [\[224\]](#) estudiaron un grupo de casos y controles del estudio nacional de prevención de defectos al

nacimiento en Estados Unidos y observaron que estas mujeres tuvieron mayor riesgo de tener hijos con cardiopatías. Específicamente, para Tetralogía de Fallot estas mujeres tuvieron más riesgo que quienes tenían un hijo previo (RM 1.34 (1.11-1.62)).

**SOBREPESO/OBESIDAD:** La prevalencia de sobrepeso y obesidad se incrementa en el mundo a un ritmo acelerado y México no ha sido la excepción [226]. Distintos estudios han demostrado una asociación significativa entre el exceso de peso y la ocurrencia de CC [227-231]. Sin embargo, para tetralogía de Fallot a diferencia de otras cardiopatías, no se ha podido demostrar una asociación estadística significativa con este factor de riesgo [227, 230, 231].

**ESTRÉS:** La relación entre el estrés materno y los defectos al nacimiento ha sido investigada en múltiples estudios. Se cree que uno de los mecanismos que podría explicar este efecto es el incremento en la producción de corticoesteroides [232]. Estudios en modelos animales han demostrado el efecto teratogénico de los corticoesteroides [233]. Liu y cols en una muestra de casos y controles de China reportaron que tres veces mayor riesgo de CC en mujeres que sufrieron de un evento estresante durante el periodo periconcepcional [234]. Para tetralogía de Fallot Carmichael y cols mostraron un incremento de riesgo para eventos de estrés sin embargo sin ser estadísticamente significativo [232].

### 1.6.2 EXPOSICIONES MATERNAS A MEDICAMENTOS TERAPÉUTICOS

El uso de distintos medicamentos durante el periodo periconcepcional ha sido asociado con el desarrollo de cardiopatías congénitas. Desde medicamentos antidepresivos [235-238], antihipertensivos [239, 240, 236, 241, 237, 238], antibióticos [242-244], antiinflamatorios no esteroideos [245-248] y antiasmáticos [249, 250]. Estos últimos incluyen agonistas beta 2 adrenergicos, corticoesteroides, anticolinérgicos, ácido cromoglicico, xantinas y antagonistas del receptor de leucotrienos. Källén y cols estudiaron el riesgo de malformaciones congénitas en hijos de madres que usaron medicamentos antiasmáticos durante el embarazo y observaron un incremento de riesgo para tetralogía de Fallot en quienes utilizaron medicamentos antiasmáticos con una RM 1.66 (IC95% 1.05-2.62) [249].

Por otra parte, el uso de suplementos que contienen ácido fólico pueden reducir el riesgo de algunos tipos de CC, de forma similar a la reducción del riesgo de defectos de cierre de tubo neural observada con ácido fólico [251]. Un ensayo clínico aleatorizado reportó que el uso de multivitamínicos que contienen folatos se asociaron con una reducción del riesgo en ~60% para CC [251] y esta reducción ha sido consistente en otros estudios [252, 253]. Los subtipos de CC que mostraron reducción significativa en el riesgo fueron la trasposición de grandes arterias y los defectos septales ventriculares [254, 255]. Sin embargo otros estudios no han podido demostrar una asociación significativa entre el consumo de ácido fólico y la reducción del riesgo de CC [246, 256-258].



El mecanismo biológico del efecto protector del ácido fólico se desconoce. Una hipótesis señala que el ácido fólico estimula las reacciones de metilación. Además, en las ratas con deficiencia de ácido fólico se ha observado que sus descendientes presentan defectos septales ventriculares, defectos del tracto de salida y de los grandes vasos [259, 260].

### 1.6.3 EXPOSICIONES A DROGAS

Muchos estudios han documentado efectos teratógenos con el uso de diferentes drogas, en algunos casos con resultados contradictorios. Entre las drogas estudiadas como factores de riesgo para cardiopatías congénitas se encuentran en la categoría de drogas legales el alcohol [261-263] y el tabaco [264-267] en donde se han documentado asociaciones consistentes en muchos estudios. En la categoría de drogas ilegales se encuentran la cocaína [268, 269] y la marihuana [270] que han mostrado asociación con defectos septales ventriculares.

### 1.6.4 EXPOSICIONES A CONTAMINANTES AMBIENTALES

Algunos estudios observacionales han documentado asociaciones entre la exposición materna a contaminantes ambientales y malformaciones congénitas [271]. Recientemente se ha investigado el efecto de la exposición a contaminación del aire y el desarrollo de CC [272-275, 271, 276]. Sin embargo, los resultados de estos estudios aún no han sido concluyentes.

La exposición ocupacional a ciertos compuestos químicos, especialmente durante el periodo periconcepcional, influye el sistema reproductivo tanto de hombres como mujeres y podría estar asociado con los defectos en la salud de los hijos. Los mecanismos propuestos incluyen una reducción en la calidad del espermatozoides, una disrupción en la programación epigenética durante la maduración de las células espermáticas, un defecto en la maduración de los oocitos y un deterioro de los procesos de embriogénesis [277, 278]. Recientemente se documentó que la exposición materna a solventes durante el periodo periconcepcional fue asociada con coartación de la aorta, síndrome de corazón izquierdo hipoplásico y transposición de grandes arterias [210]. Otros compuestos que han mostrado asociación con CC son el cianuro o metales pesados [279], ftalatos o compuestos alquilfenólicos [280] y tricloroetileno [281]. Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar la asociación entre el agua contaminada con tricloroetileno y las CC [282, 283].

## 1.7 FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS

El estudio de los factores genéticos ha permitido conocer y comprender muchos de los mecanismos que participan en el desarrollo tanto del corazón normal como de los defectos que dan origen a las cardiopatías congénitas. Sin embargo, tanto la Tetralogía de Fallot como las cardiopatías congénitas son genéticamente heterogéneas.

### 1.7.1 ESTUDIOS DE AGREGACIÓN FAMILIAR

Los primeros estudios fueron reportados a manera de reportes de casos desde la década de los 1950s. Pitt reportó una familia con 11 integrantes que tenían TF o alguno de sus componentes. En esta familia el diagnóstico fue confirmado mediante cirugía o autopsia en 5 de los 11 casos [284]. Boon y cols estudiaron 100 casos con TF y sus familias, observaron tendencia a la agregación familiar, estimaron que la heredabilidad en este grupo fue de 54% y el riesgo de recurrencia en la hermandad fue del ~1% para TF y ~2% para cualquier otro defecto cardíaco [285].

Así mismo, Der Kaloustian y cols reportaron una familia quienes parecían ser portadores de una forma recesiva de TF. En esta familia los padres tenían una relación consanguínea de tipo primos en primer grado y tuvieron dos de hijas con TF y atresia pulmonar. En estas hermanas la circulación bronquial y la anatomía de la válvula pulmonar fueron idénticas [286]. Otros casos también familiares

fueron reportados por Lynch y cols [\[287\]](#) en un par de hermanos con anomalías de cabeza y cuello; y por Friedberg [\[288\]](#) en tres generaciones sucesivas.

Jones y Waldman reportaron una familia con 6 personas en 3 generaciones sucesivas que tenían una combinación de fositas preauriculares (4/6), TF (3/6), clinodactilia del quinto dedo (6/6) y facies característica (5/6) (frente amplia y ojos prominentes) [\[289\]](#). Pankau y cols describieron una familia en la cual 3 de 5 hermanos presentaban TF [\[290\]](#). Pacileo y cols también describieron otra familia con TF en 3 hermanos y un primo [\[291\]](#).

Digilio y cols estudiaron el riesgo de recurrencia en 102 familias con TF después de excluir casos con microdelección 22q11.2. Los resultados de este estudio mostraron que la frecuencia de cardiopatías congénitas fue de 3% en la hermandad, 0.5% en progenitores, 0.3% en abuelos, 0.2% en tíos y 0.6% en primos hermanos. Los autores sugieren además de los genes localizados en la región de 22q11 deberían existir otros genes involucrados en la agregación familiar de los casos con TF [\[292\]](#).

## 1.7.2 GENES ASOCIADOS CON TETRALOGÍA DE FALLOT (TF)

Se estima que del total de pacientes con TF, aproximadamente ~15% tienen una deleción en la región de 22q11.2, 7% tienen trisomía 21, 4% tienen mutación en NKX2.5, 1-2% tienen mutaciones en JAG1. Otros genes asociados con TF son: El gen de la proteína con dedos de zinc multitipo 2 (*ZFPM2*) [293], el gen del factor de diferenciación y crecimiento 1 (*GDF1*) [294], *GATA4* [295] y *GATA6* [296], el factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma tipo 1 (*TDGF1*), *NODAL* [297].

El análisis de ligamiento y los estudios de genes candidato han permitido identificar mutaciones puntuales en genes que son asociados con TF. Se estima que 1-5% de los casos con TF podrían ser causados por estas mutaciones tanto para los casos sindrómicos (ej. Síndrome de Alagille) como los no sindrómicos [298, 299]. Para la mayoría de estas mutaciones se ha descrito un patrón de herencia de tipo autosómico dominante, con penetrancia reducida y expresividad variable. La mayoría de las mutaciones ocurren en genes que codifican para factores de transcripción y moléculas de señalización que son importantes para el desarrollo cardíaco [300, 19, 301, 14].

### 1.7.2.1 MUTACIONES EN *NKX2.5*

Las mutaciones en el factor de transcripción *NKX2.5* han sido asociadas con CC y con TF no sindrómica [302-305, 100, 306]. El gen *NKX2.5* codifica para un factor de transcripción de tipo homeobox, se localiza en 5q34, tiene funciones importantes para el desarrollo y formación del corazón. Las mutaciones en este gen han sido asociadas con defectos del septum auricular [307] y con TF [304].

Las mutaciones en *NKX2.5* han sido descritas en asociación con TF no sindrómica y podrían explicar el ~4% del total de estos casos [304, 308]. Golmuntz y cols estudiaron 150 pacientes con TF y encontraron 6 (4%) con mutaciones en *NKX2.5*. En estos 6 casos se identificaron 4 mutaciones heterocigotas. Aunque fueron pocos los casos también observaron una mayor prevalencia de atresia pulmonar y arco aórtico derecho en los portadores de estas mutaciones comparado con el resto de los casos con TF. La mayoría de los reportes de estas mutaciones ha sido sobre casos aislados, sin embargo también se han reportado algunos casos de mutaciones que segregan en familias [303, 304].

#### 1.7.2.2 MUTACIONES EN *JAG1*

El gen *JAG1* se localiza en la región 20p12.1-p11.23, codifica para la proteína jagged-1, la cual es ligando para el receptor NOTCH [139, 142, 309, 310]. Las mutaciones en este gen originan síndrome de Alagille, una enfermedad multisistémica con afectación hepática, esquelética, ocular y cardíaca [311-313]. La cardiopatía más frecuente en este síndrome es la TF la cual se puede

presentar hasta en un 7-16% de los casos [314-317]. Las mutaciones en *JAG1* han sido observadas en casos quienes no tienen el fenotipo característico del síndrome de Alagille [318] y de 1.3-3.2% en los casos con TF no sindrómica [317, 299].

#### 1.7.2.3 MUTACIONES EN *ZFPM2/FOG2*

El gen *ZFPM2/FOG2* se localiza en la región 8q23 y codifica para una proteína con dedos de zinc que pertenece a la familia de factores de transcripción FOG. La proteína *ZFPM2/FOG2* se expresa tempranamente en el desarrollo embriológico [319]. Es un cofactor esencial que actúa formando heterodimeros con factores de transcripción de la familia GATA (*GATA4*, *GATA5* y *GATA6*) [320]. Pizzuti y cols observaron mutaciones en 2/47 (4.2%) casos esporádicos con TF [319]. De Luca y cols encontraron una mutación (0.06%) en 178 pacientes [293].

#### 1.7.2.4 MUTACIONES EN *GATA*

Los factores de transcripción *GATA* han sido extensamente estudiados en CC [321-327]. El gen *GATA4* se localiza en la región 8p23.1-p22. Mutaciones en *GATA4* han sido identificadas en pacientes con TF y defectos septales auriculares y ventriculares [323, 324, 327]. El gen *GATA4* es también el candidato principal para explicar las cardiopatías congénitas observadas en el síndrome por delección 8p23.1, el cual incluye dismorfias faciales, microcefalia, retraso mental y malformaciones congénitas [328]. Además, la duplicación de 8p23 ha sido

asociada con una presentación de TF sindrómica con penetrancia incompleta [329]. Tomita-Mitchiell y cols estudiaron la región exónica de *GATA4* en 628 casos con cardiopatías conotruncales e identificaron 4 mutaciones en 5 pacientes, 1 de los cuales tenía TF, por tanto la frecuencia de la mutación fue de 1 (0.5%) en 201 casos con TF esporádica [323]. La función conjunta de los factores *GATA4* y *GATA6* ha sido asociada con TF así como tronco arterioso y defectos septales [330, 325, 326].

El gen *GATA6* se localiza en la región 18q11.1-q11.2 codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc y tiene un papel importante en la regulación de la diferenciación celular y organogénesis en vertebrados. Maitra y cols estudiaron los 7 exones del gen *GATA6* en 310 niños con diferentes cardiopatías congénitas y encontraron 4 casos con mutaciones, de los cuales 1 paciente tuvo una TF aislada [326]. Lin y cols estudiaron 270 casos con cardiopatías congénitas esporádicas por secuenciación directa y observaron la presencia de la misma mutación de *GATA6* en tres pacientes, uno con TF y dos con defectos septales auriculares [325].

#### 1.7.2.5 MUTACIONES EN *GDF1*

El gen del factor de crecimiento y diferenciación 1 (*GDF1*), se localiza en la región 19p12, codifica para un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas (BMP) y de la superfamilia TGF beta [331]. Karkera y cols estudiaron 375 casos con diferentes cardiopatías congénitas y aisladas, observaron 8 casos con distintas



mutaciones, 3 mutaciones (0.8%) en casos con TF, dos en pacientes con defecto septal auriculoventricular, dos con transposición de grandes arterias y uno con doble salida del ventrículo derecho [294].

#### 1.7.2.6 MUTACIONES EN *TDGF1*

El gen *TDGF1* se localiza en la región 3p21.31, codifica una proteína relacionada con el factor de crecimiento epidérmico que contiene una región cripto, FRL-1 y un dominio críptico. Roessler y cols estudiaron los genes *GDF1*, *CFC1*, *TDGF1*, *FOXH1* y *SMAD2* en 375 individuos no relacionados con cardiopatías congénitas y encontraron una secuencia potencialmente disruptiva en el gen *TDGF1* en 2 de 121 casos con TF [332].

#### 1.7.2.7 MUTACIONES EN *NODAL*

El gen del factor de diferenciación del crecimiento nodal (*NODAL*), se localiza en la región 10q22.1, codifica para una proteína miembro de la superfamilia de TGF-beta y es muy importante para la formación del mesodermo y las estructuras del patrón axial del desarrollo del embrión [333]. El gen *NODAL* está localizado en 10q22.1. Roessler y cols estudiaron 375 casos no relacionados con diferentes cardiopatías congénitas y 400 casos con holoprosencefalia. En este estudio la malformación más frecuentemente asociada con alteraciones en la señalización *NODAL* fueron las cardiopatías conotruncuales de tipo tetralogía de Fallot y con menor frecuencia la transposición de grandes arterias y doble salida de ventrículo

derecho. 6 (1.6%) de 375 pacientes con TF fueron portadores alelos con una actividad biológica reducida significativamente de NODAL [\[332\]](#).

### 1.7.3 ESTUDIOS SOBRE VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS (CNVS) Y TETRALOGÍA DE FALLOT

Las variaciones en el número de copias (del inglés CNVs) son cambios estructurales polimórficos en el genoma y consisten de inserciones, deleciones y duplicaciones [\[334, 335\]](#). Se estima que estas variaciones constituyen  $\approx 12\%$  del genoma humano y representan una gran parte de la diversidad genómica entre los individuos [\[335\]](#). Las CNVs se localizan en diferentes tipos de secuencias, incluyendo genes, regiones reguladoras y secuencias intergénicas. Los primeros estudios definieron estas variaciones como aquellas que tuvieran un tamaño mayor de 1kb [\[336\]](#). Sin embargo, ahora los nuevos estudios de secuenciación de genomas completos han permitido incluir variaciones desde un rango  $>50\text{pb}$  de longitud [\[337\]](#). Las CNVs podrían incrementar el riesgo de ciertas enfermedades a través de mecanismos dependientes de dosis génica, por exceso o haploinsuficiencia; o bien, modificando la expresión de genes al estar presentes en regiones reguladoras [\[338-341\]](#).

Los primeros estudios sobre CNVs y TF fueron realizados con plataformas de baja resolución, en ellos se sugería que las CNVs podrían ser importantes para el desarrollo de la cardiopatía congénita [\[342-346\]](#). De los estudios con plataformas

de alta resolución destacan el de Greenway y cols [347] quienes realizaron un estudio de asociación de genoma completo en tríos con casos con TF utilizando un arreglo de SNPs de Affymetrix 6.0. Esta investigación se realizó en dos fases, en la primera se estudiaron 121 tríos (caso con TF y progenitores no afectados). Las CNVs identificadas en los casos de TF, pero ausentes en las muestras de los progenitores fueron consideradas como CNVs *de novo*. Para distinguir entre variantes patogénicas y polimorfismos de número de copias (CNP) se examinaron todas las CNVs *de novo* en 2,265 controles genotipificados con el arreglo Affymetrix 6.0. De los 121 casos con TF se eliminaron 7 Individuos quienes tuvieron un exceso de CNVs *de novo*. De los 32 CNVs *de novo*, 11 fueron validados de forma independiente usando MLPA y 21 (66%) fueron falsos positivos; 12 CNVs fueron heredados y 9 CNVs no pudieron ser confirmados por MLPA. En resumen en la primera fase, el análisis de GWAS y su validación permitió identificar 11 CNVs raros *de novo* en 10 loci de 114 tríos con TF. En la segunda etapa, se estudiaron 398 casos con TF no sindrómica y en combinación con el estudio amplio del genoma se encontraron un total de 17 CNVs en 10 *loci* de 512 casos (3.32%) (ver tabla 1). Las CNVs en cada uno de éstos *loci* fueron muy raras o ausentes en los 2,265 controles. Dado que las CNVs pequeñas podrían escapar a la detección por el arreglo, los datos permitieron definir un estimado de 9.6% (11/114) para CNVs *de novo* en casos con TF aislada.

**TABLA 1. 17 CNVs identificados en 10 *loci* en 512 individuos con Tetralogía de Fallot no sindrómica (estudio de Greeway y cols) [347]**

Localización	Propósito	Inicio	Longitud	Herencia	Tipo	Control	P	RM	Genes
1q21.1	749	144643825	1,196,685	<i>De novo</i>	Ganancia	0	0.0002	22.3	<i>PRKAB2, FMO5, CHD1L, BCL9, ACP6, GJA5</i>
	201.670 <sup>a</sup>	144963019	1,334,788	<i>De novo</i>	Ganancia				
	200.430 <sup>a</sup>	143543612	3,262,280	Heredado	Ganancia				
	200.250 <sup>a</sup>	144965244	1,346,170	NA <sup>c</sup>	Ganancia				
	3701 <sup>a</sup>	143667750	3,878,714	NA <sup>c</sup>	Perdida				
3p25.1	756	9795587	12,380,330	<i>De novo</i>	Ganancia	0	0.03	8.9	<i>RAF1, TMEM40</i>
	419 <sup>b</sup>	12605755	175,375	Heredado	Ganancia				
7p21.3	2102	8900139	190,905	<i>De novo</i>	Ganancia	0	0.03	8.9	Ninguno
	3648 <sup>b</sup>	8887744	58,603	Heredado	Perdida				
22q11.2	2573	17185856	2,865,869	<i>De novo</i>	Perdida	1 <sup>d</sup>	0.09	8.9	<b><i>TBX1</i></b>
	2360	17190089	2,293,683	<i>De novo</i>	Perdida				
9q34.3	1275	138337602	190,917	<i>De novo</i>	Perdida	0	0.2	>100	<b><i>NOTCH1</i></b>
20p12.2	201.650	8682747	3,935,604	<i>De novo</i>	Perdida	0	0.2	>100	<b><i>JAG1</i></b>
2p23.3	3208	25951553	266,886	<i>De novo</i>	Ganancia	0	0.2	>100	<i>ASXL2, KIF3C, RAB10</i>
2p15	216	60152611	1,810,354	<i>De novo</i>	Ganancia	0	0.2	>100	Nueve genes
4q22.1	2231	89403169	45,684	<i>De novo</i>	Ganancia	0	0.2	>100	<i>PPM1K</i>
10q11.21	201.040	43904505	53,379	<i>De novo</i>	Perdida	0	0.2	>100	Ninguno

**Localización**, localización citogenética; **Propósito**, pacientes de la cohorte de los 512 casos con TF; **Inicio**, inicio de la CNV basado en el genoma de referencia build 36.1; **Longitud**, tamaño de la CNV en pares de bases; **Herencia**, si la CNV se encontró en uno de los progenitores basados en el arreglo y/o MLPA; **Control**, frecuencia de las CNVs en el grupo control (2,265 individuos); **P**, valor *P*, probabilidad de que ese número de variación se haya observado en los 512 casos dado la frecuencia en controles determinada usando la prueba exacta de Fisher's a dos colas; **RM**, razón de momios (calcula que incluye los progenitores con los CNVs como controles); **Genes**, genes de referencia dentro del locus expresado en el tracto de salida del ventrículo derecho. Genes conocidos asociados con TF en negritas.

<sup>a</sup> Identificado del tamizaje de MLPA de 398 casos con TF

<sup>b</sup> CNV heredado identificado del arreglo 6.0 en los tríos con TF.

<sup>c</sup> DNA de progenitores no disponible (NA)

<sup>d</sup> CNV control perdido

Otro estudio que utilizó una plataforma de Affymetrix, fue el realizado por Wang y cols [\[348\]](#) en una muestra de 297 pacientes con cardiopatías congénitas no sindrómicas (124 casos con TF y 173 con CIV). Estos autores estudiaron el gen *NOTCH1* mediante PCR cuantitativa para la detección de CNVs y posteriormente estudiaron 439 controles sanos para confirmar los resultados con la plataforma de Affymetrix 6.0. En este estudio se encontró una delección y una duplicación en el exón 23 del gen *NOTCH1* en un paciente con TF (1.67% 2/124).

Por otra parte, Tomita-Mitchell y cols [\[349\]](#) estudiaron las CNVs de 100 genes de riesgo para cardiopatías congénitas en una muestra de 954 casos con diferentes cardiopatías y comparados con 2 grupos control, un de individuos sanos (2,026 individuos) y otro con cardiopatía coronaria (880 casos). Para la identificación de las CNVs se utilizó un arreglo de Affymetrix 6.0. Los resultados mostraron que del total de casos analizados, 14% tuvieron una alteración cromosómica y 4.3% tuvieron grandes y raras CNVs. En el caso de TF, los autores estudiaron 73 casos con TF de los cuales 57 fueron de tipo no sindrómica, y en ellos se observaron 5 (8.77%) CNVs (2 delecciones y 3 ganancias) de estas solo 6 estuvieron presentes en genes relacionadas previamente con cardiopatías congénitas.

Bansal y cols [\[350\]](#) estudiaron 8 casos esporádicos con TF sin otras manifestaciones mediante la resecuenciación de exones de 867 genes y 167 microRNAs. Los resultados mostraron 4 CNVs de tipo ganancia que afectaron a 3 genes, de los cuales 2 son reguladores importantes del desarrollo cardíaco

(*NOTCH1*, *ISL1*) y uno está localizado en una región asociada con malformaciones cardíacas (*PRODH* en 22q11).

Bittel y cols [351] estudiaron 34 niños con TF esporádica sin delección en 22q11.2 usando un microarreglo de hibridación genómica comparativa de alta resolución gen céntrico (gcCGH) de 591 genes implicados en el desarrollo o función cardíacos. Los resultados mostraron un total de 613 CNVs desde 78pb a 19.5Mb, en 16 individuos se observaron un total de 33 CNVs que incluyeron 13 diferentes genes de asociación reconocida con el desarrollo cardíaco. Adicionalmente, se estudió tejido de ventrículo derecho en 13 casos y solo se observó una correlación entre el CNV y la expresión del gen para *GSTT1*.

Silversides y cols [352] analizaron las CNVs de 291 adultos no relacionados con TF no sindrómica con un arreglo de Affymetrix 6.0. Los resultados generales mostraron que los adultos con TF tuvieron mayor cantidad de CNVs raras (<0.1% en una población control) y grandes (>500Kb) comparados con controles (8.82% vs 4.33%,  $p=0.0117$ ). Estas CNVs no fueron observadas en las muestras de 2,773 controles. Si se considera solo las CNVs >500 kb se observaron un total de 23 (8.25%) CNVs localizadas en exones en los 291 casos, de ellas 5 (1.72%) fueron delecciones y 18 (6.19%) ganancias. Entre los genes de interés que observaron con estas CNVs se encontró el gen *PLXNA2* que codifica para plexina A2, receptor de semaforina el cual no había sido previamente reportado.

Somedi y cols estudiaron 283 tríos con con TF y 1538 controles con una plataforma de Illumina 660WQuad SNP array. Encontraron asociación de deleciones génicas raras con cardiopatías congénitas (RM 1.8  $p= 0.0008$ ). CNVs raras de *novo* fueron observadas en 5%de los tríos. Algunas de estas CNVs involucraron a genes que participan en el desarrollo cardiaco (*HAND2* y *GJA5*). Los autores estiman que las deleciones génicas raras contribuyen con el 4% del riesgo de cardiopatías congénitas esporádicas en la población.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante el estudio de tríos (caso, madre y padre) las alteraciones en las CNVs de pacientes con tetralogía de Fallot no sindrómica.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar mediante la técnica de MLPA las CNVs relacionadas a cardiopatías congénitas correspondientes a los genes *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *BMP4* y *CRELD1* y 48 sondas distribuidas a lo largo de las regiones 10p14, 4q35, 17p13, 22q11 y 22q13 en los casos y sus progenitores.
2. Establecer una posible correlación genotipo-fenotipo de ciertas CNVs relacionadas a la tetralogía de Fallot no sindrómica en función de las características de cigosidad (homocigoto o heterocigoto).
3. Confirmar la presencia de aquellas CNVs asociadas a TF por medio de una técnica de biología molecular diferente a la empleada (ej. PCR en tiempo real).

### 2.3 OBJETIVO SECUNDARIO

Describir los factores de riesgo asociados a Tetralogía de Fallot en la muestra de estudio: Factores maternos, ambientales y genéticos.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio descriptivo, observacional, transversal y prolectivo.

#### 3.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra fue integrada por tríos (caso, padre y madre) reclutados durante el periodo de Marzo 2011 a Febrero de 2012. El muestreo se realizó por conveniencia con un número de 35 trios, en función del tiempo necesario para el reclutamiento y análisis dentro de la duración de la maestría. Los casos con TF fueron reclutados de los pacientes que acudieron para seguimiento a la Consulta Externa de Cardiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH) y de aquellos que fueron sometidos a intervención quirúrgica para corrección del defecto.

#### 3.3 VARIABLES

Variable dependiente: Tetralogía de Fallot

Variables independientes: Variación en el número de copias y factores de riesgo incluidos en la encuesta clínico genética (véase anéxos).

### 3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

#### 3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a) Paciente con Tetralogía de Fallot
- b) Género masculino o femenino
- c) Cualquier edad
- d) Ambos progenitores del caso dispuestos a colaborar en el estudio
- e) Firma de la carta de consentimiento informado (véase anexos). En el caso de que exista un hermano afectado del propósito éste también será invitado a participar.

#### 3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Falta de precisión diagnóstica sobre el tipo de CC.

Casos sindrómicos con TF.

### 3.4.3 CRITERIO DE ELIMINACIÓN

Que la familia haya aceptado participar, firmado la carta de consentimiento informado, pero que por alguna razón decidan no continuar dentro del estudio.

### 3.5 DIAGNÓSTICO, ENCUESTA CLÍNICO-GENÉTICA Y TOMA DE MUESTRA

1. El diagnóstico preciso de la TF se realizó por los cardiólogos pediatras del INCICH mediante evaluación clínica y de gabinete [\[353\]](#).

2. A los tríos estudiados se les aplicó una encuesta de antecedentes clínico-genéticos (Véase ANEXO).

3. A todos los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión se les tomó una muestra de sangre periférica o células de mucosa oral para extracción de DNA y posterior genotipificación de las CNVs localizados en las siguientes regiones cromosómicas: 3p25, 4q35, 5q35, 8p22-23.1, 10p14, 12q24, 14q22, 17p13, 22q11 y 22q13.

### 3.6 MÉTODOS DE LABORATORIO

Se realizó la técnica de biología molecular MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) para el reconocimiento de las CNVs en los tríos a estudiar. A continuación se describe el procedimiento general.

#### 3.6.1 GENOTIPIFICACIÓN DE CNVS EN LAS REGIONES DE INTERÉS POR MLPA

Los kits SALSA P250 Y P311 de MLPA-Holland® contienen 48 y 45 sondas, respectivamente. Los productos de amplificado van de 124 a 481 nt. Estos kits permiten la detección de deleciones/duplicaciones de uno más exones en diversas regiones intragénicas o cercanas a los genes: *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *BMP4* y *CRELD1K*, todos ellos relacionados con CC. Así como de la región 22q11, la cual se ha visto relaciona en síndrome de microdelección/microduplicación. El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

*1- Desnaturalización del DNA y Hibridación de las sondas:*

Se diluye la muestra de DNA (20-500 ng DNA) con TE a 5 µL. Se coloca en un termociclador y desnaturalizar durante 5 minutos a 98°C luego incubar a 25°C para agregar 1,5 µl de SALSA Probe-mix (kit P014) y 1,5 µl buffer de MLPA, todo se mezcla con cuidado y se incuba 1 minuto a 95°C y luego 16 horas a 60°C.

*2- Reacción de ligación:*

Se prepara una mezcla de ligasa agregando 3  $\mu$ l de Ligase-65 buffer A, 3  $\mu$ l de Ligase-65 buffer B, 25  $\mu$ l agua estéril y 1  $\mu$ l de Ligase-65 por cada reacción de hibridación. La mezcla se mantiene en hielo no más allá de una hora.

Se reduce la temperatura del termociclador a 54°C y añade 32  $\mu$ l de la mezcla con Ligase-65 a cada muestra y se incuba a 15 minutos a 54°C y luego 5 minutos a 98°C.

### *3- Reacción de PCR:*

Por cada muestra, se prepara una mezcla de PCR con 2  $\mu$ l de SALSA PCR-primers, 2  $\mu$ l SALSA Enzyme Dilution buffer, 5,5  $\mu$ l agua estéril y 0.5 de SALSA Polymerase por cada muestra de reacción de ligación. A cada tubo que contiene 40  $\mu$ l de reacción de ligación agregar 10  $\mu$ l de mezcla de PCR.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en 33 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C y un paso final de extensión de 20 minutos a 72°C.

### *4.- Electroforesis capilar:*

Los productos se separan por electroforesis capilar con el fin de identificar pérdidas o ganancias de material genético. Las áreas de cada pico serán normalizadas con el área del pico de un control sano.

El kit contiene varios fragmentos de control que sirven como marcadores de peso molecular. La delección de una copia de la secuencia blanco de una sonda, generalmente será identificada por una reducción en el área relativa del pico

asociado al producto amplificado de dicha sonda en un 35-55 %. Una ganancia en el número de copias de la secuencia blanco de dos a tres copias/genoma diploide será identificada por un aumento en el área relativa del pico asociado a dicha sonda entre 30 y 55 %. La presencia de deleciones y amplificaciones deberá ser confirmada por otro método de biología molecular.

#### 4. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 35 tríos con algún descendiente con TF y sus progenitores. De estas familias incluyeron un total de 36 individuos con TF no sindrómica. El 38.89% de los casos fueron mujeres y 61.11% fueron hombres. El promedio de edad fue de  $21.8 \pm 9.1$  años y los rangos mínimos y máximos de edad fueron de 9 meses a 35 años. La edad materna al momento del embarazo fue de  $22.28 \pm 5.93$  años y la edad paterna de  $26.94 \pm 6.42$  años. Las familias fueron originarias de diferentes estados a lo largo de la república mexicana. La mayoría de los casos nacieron por parto eutócico (82.86%) y el resto fueron obtenidos por cesárea.

El promedio del peso al nacimiento reportado fue de  $2848.21 \text{ gr} \pm 657.83$ , en 7 casos el peso fue menor de 2500 gr y solo en un caso el peso fue de 4000 gr. Al nacimiento la única complicación referida fue la prematurez en dos casos. En cuanto a los factores de riesgo materno conocidos no se observó la presencia de alguno en este grupo de casos. En relación al consumo de algún tipo de vitamina

como suplemento durante el embarazo 19 (54.3%) respondió afirmativamente; y de ellas, solo 8 refirieron su consumo durante el primer trimestre.

El consumo materno de ácido fólico en forma de suplemento fue empleado en 15 (42.8%), sin embargo solo 7 de ellas lo refirieron haberlo consumido durante el primer trimestre. Ninguna de las madres refirió consumo de drogas o alcohol durante el periodo periconcepcional y solo en un caso la madre refirió haber fumado durante el embarazo. En relación a los antecedentes familiares solamente una familia presentó dos casos por embarazo gemelar, en ambos se observó la presencia de la TF.

A cada individuo de las familias estudiadas se le realizó el estudio molecular de MLPA para el análisis de las CNVs. Se estudiaron un total de 106 individuos de las familias de interés (casos, madres y padres), además de 20 individuos control de referencia para la técnica, mediante los kits de MLPA P311 y P250. De los resultados obtenidos con el Kit P250 se logró identificar una microdelección en el gen *TBX1* en una de las 35 familias analizadas (2.8%). En este caso se observó la delección correspondió a una región del exón 2 del gen *TBX1* (Figura 1 Anexos), la cual fue confirmada por PCR en tiempo real (Figura 2 Anexos).

Ninguno de los progenitores de este caso presentó la delección de *TBX1*. Para descartar la microdelección 22q11 clásica del síndrome de

DiGeorge/Velocardiofacial en el paciente, se realizó FISH el cual fue negativo (figura 4). En el resto de familias analizadas no se observaron otras variaciones en el número de copias con la técnica empleada.

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se identificó una CNV *de novo* del tipo delección del exón 2 del gen *TBX1* en un caso con diagnóstico de TF, la cual no fue detectada por técnicas convencionales (FISH). Este hallazgo representa el 2.8%(1/35) lo cual es casi similar a la reportado en otras poblaciones (3-10%) [349]. Dada la importancia funcional durante el desarrollo embriológico temprano de las estructuras cardiacas, esta microdelección y el efecto dependiente de dosis génica en el gen *TBX1* [354, 355, 150, 195, 198, 188, 356, 306] podría estar implicada en el desarrollo de la Tetralogía de Fallot [357]. Sin embargo, en las bases de datos de genomas de referencia [358] se han reportado casos en quienes se observan delecciones similares e incluso mayores en sujetos control sin aparente fenotipo característico [359], aunque con una proporción menor (desde 1/400 a 1/1000).

En modelos de ratón, especie que tiene una homología de 98% con el gen *TBX1* en humanos [360], se ha estudiado ampliamente la función de *Tbx1* y ahora se conoce que el desarrollo de las células cardíacas progenitoras es dependiente de *Tbx1* [188, 189]. *Tbx1* es expresado en el mesodermo y endodermo de los arcos



faríngeos en el ratón [361, 362]. Además, tiene funciones muy importantes durante la migración de las células de la cresta neural y el desarrollo conotruncal [360].

La función de *Tbx1* en el desarrollo de cardiopatías congénitas como la TF no es clara. Este factor de transcripción participa en el control del equilibrio entre la proliferación y diferenciación del campo de desarrollo secundario(CDS) [185]. La ausencia de *Tbx1* parece afectar el desarrollo del CDS y producir hipoplasia del tracto de salida distal a mitad de la gestación y, en etapas fetales, un tronco arterial común [127, 186]. El número de células de la cresta neural en la región faríngea es afectado por la pérdida de *Tbx1*, lo cual también podría ocasionar defectos en la septación del tracto de salida [187, 136].

La microdelección observada en *TBX1* en la presente investigación es similar a las deleciones reportadas anteriormente por Greenway y cols en otra muestra de casos con TF [347]. De esta manera el hallazgo observado en esta muestra es congruente con lo reportado en casos de TF asociados con CNVs *de novo*.

La técnica de MLPA nos permitió analizar las CNVs de un gran número de regiones genómicas implicadas en el desarrollo de las cardiopatías congénitas, permitiendo identificar microdeleciones o microduplicaciones de manera rápida, eficiente y económica. Esto representa una alternativa útil para el estudio de estas

variantes en enfermedades complejas como las cardiopatías congénitas en donde el efecto de dosis génica podría ser un factor importante para su desarrollo.

En la presente investigación se observó una variación en la dosis génica que podría ocasionar la haploinsuficiencia de *TBX1* y estar directamente relacionada con el desarrollo de la TF. El conocimiento de variaciones con impacto potencial sobre la expresión de genes podría ser muy importante para el asesoramiento genético, tanto para este caso en cuyos padres no se encontró dicha alteración como en otras familias en quienes también se puedan encontrar variaciones de este tipo o diferentes.

A pesar de las limitaciones del presente estudio, se logró identificar y confirmar una microdelección *de novo* en el exón 2 del gen *TBX1*, en una muestra de 35 familias mexicanas. Con estos hallazgos será necesario continuar la búsqueda de variaciones en el número de copias que podrían ayudar a explicar el fenotipo de cardiopatías congénitas como la Tetralogía de Fallot.

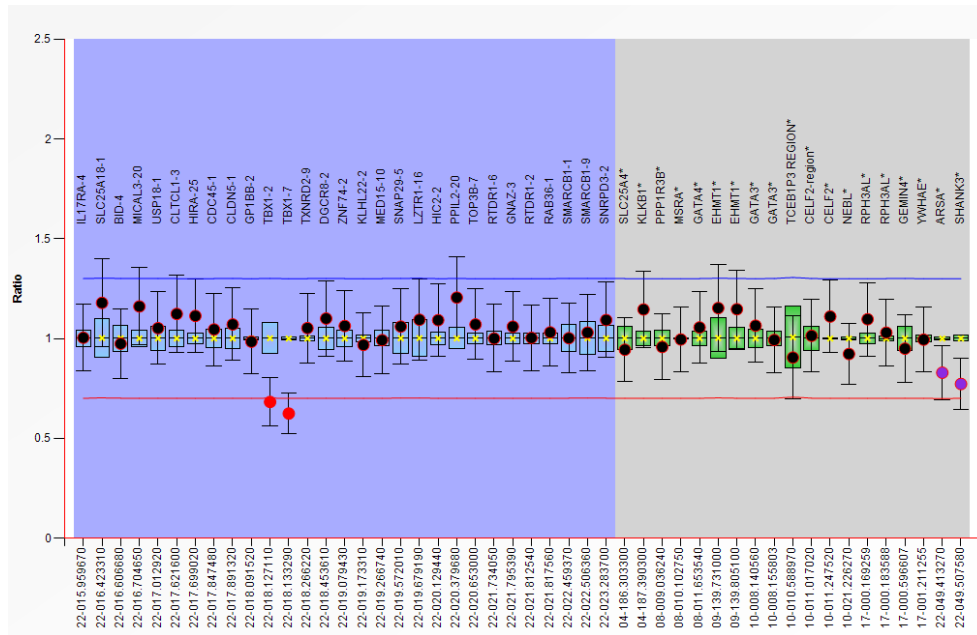
## 6. ANEXOS

### 6.1 TABLAS Y FIGURAS

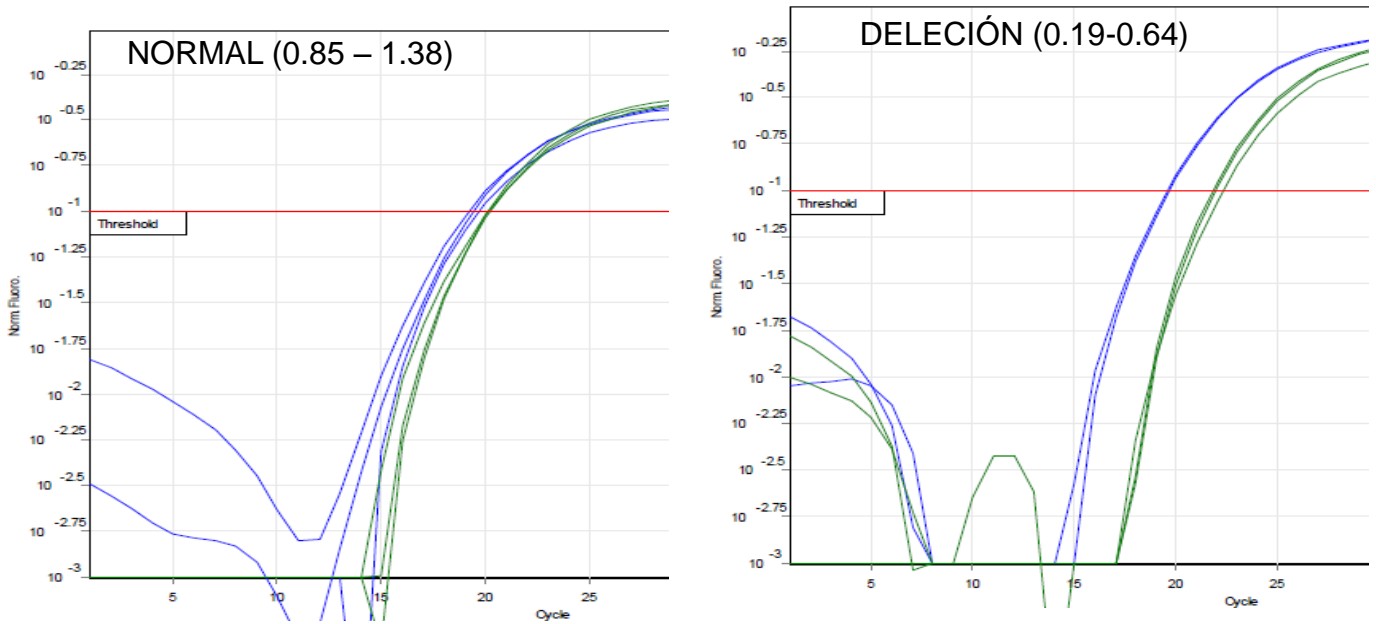
**TABLA 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA**

<b>Tríos analizados</b>	35		
<b>Casos con TF no sindrómica</b>	36		
<b>Total de individuos</b>	106		
<b>Genero</b>		<b>%</b>	
<i>Femenino</i>	14	38.89	
<i>Masculino</i>	22	61.11	
<b>Edad al momento del estudio</b>	<b>Años</b>	<b>DE</b>	<b>(MIN-MAX)</b>
<i>Media</i>	21.8	±9.1	(6 meses-35 años)
<i>Edad materna al momento del embarazo</i>	22.28	± 5.93	(15 - 35)
<i>Edad paterna al momento del embarazo</i>	26.94	±6.42	(15 – 45)
<b>Tipo de parto</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<i>Eutócico</i>	29	82.86	
<i>Cesárea</i>	6	17.14	
<b>Peso al nacimiento</b>	<b>Gramos</b>	<b>DE</b>	
	2848.21	± 657.83	(1100-4000)
<b>Consumo de vitaminas*</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<i>SI</i>	19	54.3	
<i>NO</i>	16	45.7	
<b>Consumo de ácido fólico*</b>			
<i>SI</i>	15	42.8	
<i>NO</i>	20	57.2	

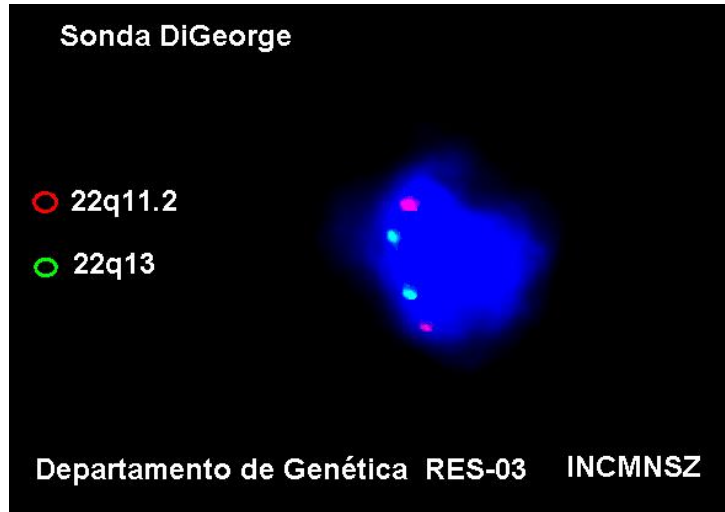
\* *Consumo materno en forma de suplemento*



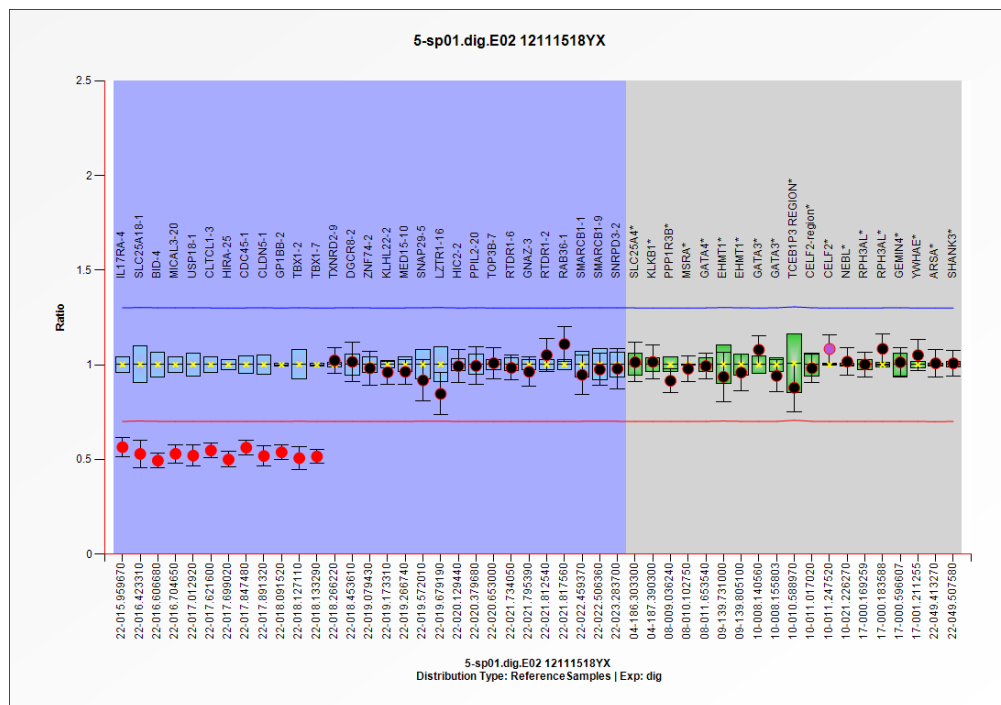
**Figura 1.** Análisis de CNVs del caso con TF analizado con resultado positivo para la delección de la sonda correspondiente al gen *TBX1* (marcada en color rojo).



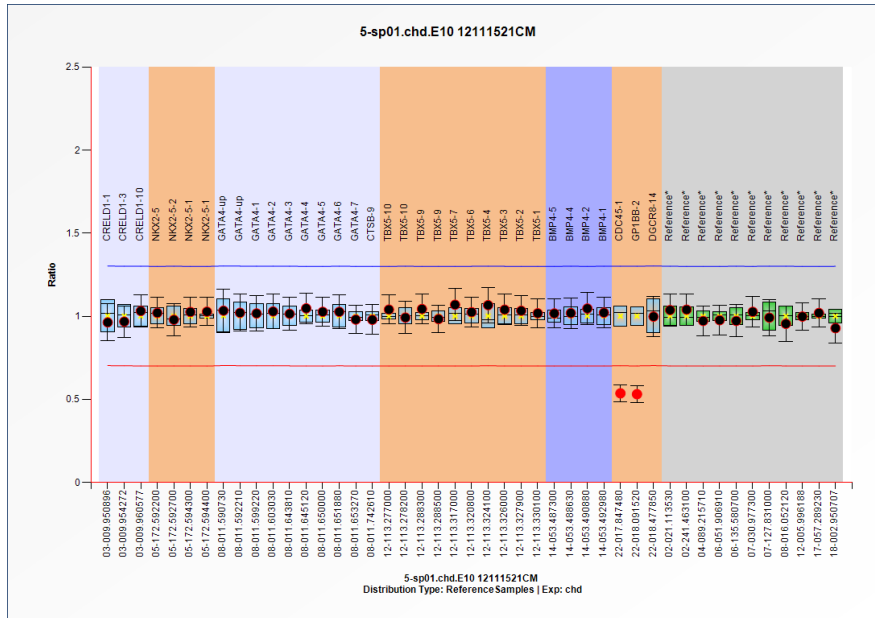
**Figura 2.** Resultados de la determinación de DGR por qPCR para el exón 2 del gen *TBX1*. a) control normal, DGR  $\approx 1$ ; b) paciente con delección de *TBX1*; DGR  $\approx 0.5$



**Figura 3.** Estudio de FISH negativo para microdelección del caso que presentó la delección del exón 2 de *TBX1*. Se observa la hibridación de ambas señales para la región 22q11.2 y la sonda control.



**Figura 4.** Resultado ejemplo de MLPA con el kit P250 analizado con el programa Coffalyser, donde se muestra una delección típica en un paciente con Síndrome de Di George y delección confirmada en 22q11. Se muestra en la imagen la disminución al 0.5 de la intensidad de fluorescencia para la región marcada en rojo.



**Figura 5.** Mismo paciente que en la figura 4, en donde se muestra el resultado ejemplo del kit P311 analizado con el programa Coffalyser en donde se observa la delección de dos sondas que marcan para los genes *CDC45* y *GP1BB*. La imagen muestra una disminución al 0.5 de la intensidad de fluorescencia para la región marcada en rojo.

## 6.2 SONDAS INCLUIDAS EN EL KIT SALSA MLPA P311-A1 CHD

### GATA4

Tamaño (nt)	Código de Sonda MLPA	Exón GATA4	Sitio de Ligación NM_002052.3	Partial sequence (20 nt adjacent to ligation site)	Distancia a la sig. sonda
361	07696-L07413	Rio Arriba	8.3kb rio arriba del exón 1	TGCTCAAGAT-AGGCACTGGA	1.4 Kb
229	07697-L07414	Rio Arriba	6.9kb rio arriba del exón 1	GGTCTTCTT-TAAAATCCAT	6.9 Kb
		Codon de Inicio	555-557		
148	08309-L08282	exon 1	22nt after exon 1	CCCAGCAGGT-AGGGCTTTTT	3.7 Kb
310	07638-L07323	exon 2	388-389	CTGGATTTAA-TACGTATATA	40.7 Kb
337	07639-L07324	exon 3	1174-1175	CAGTAGATAT-GTTTGACGAC	1.2 Kb
354	07640-L07325	exon 4	1456-1467	ACATGAAGCT-CCACGGGTA	4.8 Kb
142	07641-L07326	exon 5	1532-1533	GAACCTGAAT-AAATCTAAGA	1.8 Kb
238	07642-L07327	exon 6	1609-1610	ACTCCAGCAA-CGCCACCACC	1.3 Kb
202	07643-L07328	exon 7	1785-1786	CAAGGCTATG-CGTCTCCCGT	89.3 Kb
		Codon de Paro	1881-1883		
130	01212-L00766	CTSB	89 Kb Rio abajo	GTGTAGCAAG-ATCTGTGAGC	4309.5 Kb
124	04235-L08770	MSR1	4.3 Mb Rio Abajo	TGATCGGGGA-GCAATTGGCT	

### NKX2-5

Tamaño (nt)	Código de Sonda	Exón NKX2-5	Sitio de Ligación NM_004387.2	Partial sequence (20 nt adjacent to ligation site)	Distancia a la sig. sonda
		Codon de Inicio	177-179		
274	12468-L13483	Exon 1	422-423	GGCCAAGTGT-GCGTCTGCCT	1.0 Kb
190	12465-L13480	Exon 1	10 nt después de exón 1	GTGAGGAGGA-AACACAGGCC	1.6 Kb
427	12471-L13486	Exon 2	629-628 Rev	CTCCAGCTCA-TAGACCTGCG	0.5 Kb
266	11629-L12386	Exon 2	1105-1106	GGATTCCGCA-GAGCAACTCG	
		Codon de Paro	1149-1151		

### TBX5

Tamaño (nt)	Código de Sonda MLPA	Exón TBX5-5	Sitio de Ligamiento NM_000192.3	Partial sequence (20 nt adjacent to ligation site)	Distancia a la sig. sonda
		Codon de Inicio	668-670		
166	06207-L05127	Exon 1	509-510	CGTTGGAAGA-AGACCTGGCC	2.2 Kb
317	05686-L05128	Exon 2	341-342 NM_181486.1	ATTCTGGGTA-AGCAGTAAAC	1.9 Kb
184	05687-L05129	Exon 3A	726-727	CTGACGCAAA-AGACCTGCC	1.9 Kb
196	05688-L05130	Exon 4	837-838	TCAAAGTGTT-TCTCCATGAA	3.3 Kb
		Exon 5			
346	06209-L05132	Exon 6	1138-1139	CTTCCAGAAA-CTCAAGCTCA	3.8 Kb
247	05691-L05133	Exon 7	1213-1214	CCAGCCTAGA-TTACACATCG	28.5 Kb
		Exon 8			
160	05694-L05136	Exon 9A	1465-1466	GAGGCAAAAA-GTGGCCTCCA	0.2 Kb
283	05695-L05137	Exon 9A	1641-1642	ATTGTACCAA-GAGGAAAGGT	10.1 Kb
174	05696-L05138	Exon 10	1724-1725	GAAGATTCCT-TCTACCGCTC	1.1 Kb
301	05697-L05139	Exon 10	2869-2870	TGCTTTGGTT-TTGTCTGCCC	
		Codon de Paro	2222-2224		

El Exón 2 está presente en el transcrito alternativo 4 (NM\_181486.1)

### BMP4

Tamaño (nt)	Código de Sonda MLPA	Exón BMP4	Sitio de Ligamiento NM_001202.3	Secuencia parcial (20nt adyacentes al sitio de	Distancia a la sig. sonda
		Codon de Inicio	420-422		
25	12467-L14521	Exon 1B	285-286	CAGGGACCTA-TGGTGAGCAA	2.1 Kb
43	12472-L13487	Exon 2	98-99 NM_130851.2	CAGGCCGAAA-GCTGTTCACC	2.3 Kb
	No sonda	Exon 3			
45	12473-L13488	Exon 4	439-440	GTAACCGAAT-GCTGATGGTC	1.3 Kb
39	12469-L13484	Exon 5	801-802	CATCTGGAGA-ACATCCCAGG	
		Codon de paro	1644-1646		

El Exón 2 está presente en el transcrito alternativo 3 (NM\_130851.2)

### CRELD1

Tamaño (nt)	Código de Sonda MLPA	Exón BMP4	Sitio de Ligamiento NM_015513.3	Secuencia parcial (20nt adyacentes al sitio de	Distancia a la sig.
		Codon de Inicio	618-620		
222	12466-L14639	Exon 1B	423-424	CTTCTGGAAT-TGCATCTTAT	3.4 Kb
136	02141-L01620	Exon 3	925-926	AGTCAGACTT-CGAGTGCCAC	6.3 Kb
400	12470-L13485	Exon 10	1180-1181 NM_001031717.2	ATTCCCCATC-TTAACTGATT	
		Codon de Paro	1878-1880		

### Región 22q11 (DiGeorge)

Tamaño (nt)	Código de Sonda MLPA	Gen	Región	Secuencia parcial (20nt adyacentes al sitio de	Distancia a la sig. sonda
		Telomero			
46	05463-L05808	CDC45L	A-B región	GTTTCGTGTCC-GATTTCCGCA	244.0 Kb
20	05464-L10114	GP1BB	A-B región	CAACCGAGCT-GGTGCTGACC	386.3 Kb
38	08476-L10765	DGCR8	A-B región	CTCAGCGACT-GCACCAGTGG	

Nota: El número del exón se obtuvo de la base de datos de secuencias de referencia de genbank mRNA (NM\_).



## 6.3 SONDAS INCLUIDAS EN EL KIT SALSA MLPA P250-B1

### Región 22q11

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial(24nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomero 22p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
<b>Región del Síndrome de Cat eye (CES)</b>					
335 ¥	01082-L15012	IL17RA	GCAGAGTTATCT-GTCCTGCAGCTG	15.960 kb	464 kb
142	05457-L07613	SLC25A18	GCAGTGAGAAGA-GTCGAGTGAAGC	16.423 kb	183 kb
357	01767-L07389	BID	CTACTGGTGTTC-GGCTTCCTCCAA	16.607 kb	98 kb
178	05458-L04861	MICAL3	GAACTACCGCCT-GTCCCTGAGGCA	16.705 kb	308 kb
226	07528-L04863	USP18	CTCAGTCCCAGAC-GTGGAACTCAGC	17.013 kb	609 kb
<b>Termina la región de CES región; Inicia la región de DiGeorge; LCR22-A</b>					
191	05462-L05809	CLTCL1	TGTTGCCTTGGT-GACCGAGACCGC	17.622 kb	77 kb
160	01214-L02328	HIRA	GGAGCTGCTGAA-GGAGCTGCTACC	17.699 kb	148 kb
465	05463-L05808	CDC45	ATGTTTCGTGTC-GATTTCGCAAAA	17.847 kb	44 kb
196	01218-L06270	CLDN5	TTCGCCAACATT-GTCGTCCGCGAG	17.891 kb	200 kb
208 †	05464-L10114	GP1BB	CACAACCGAGCT-GGTGCTGACCGG	18.092 kb	36 kb
172 †	05408-L07614	TBX1	CCGGGTGAAGCT-TCGCTGGCTGCC	18.127 kb	6 kb
245 †*	10810-L14347	TBX1	TCCCTTCGCGAA-AGGCTTCCGGGA	18.133 kb	133 kb
238	01223-L05814	TXNRD2	GGAGGGTCAGGA-GAGGAGCTGCAG	18.266 kb	187 kb
148	08475-L08486	DGCR8	GGTAATGGACGT-TGGCTCTGGTGG	18.454 kb	626 kb
<b>LCR22-B</b>					
202	05927-L07395	ZNF74	CAGGCAGATTAT-TCCTCGATGCTG	19.079 kb	94 kb
283	01227-L05815	KLHL22	TCTTCGATGTTG-TGCTGGTGGTGG	19.173 kb	93 kb
316 ¥	01231-L15877	MED15 (PCQAP)	TGGCATTGGAT-GAAGACACAGGT	19.267 kb	305 kb
<b>LCR22-C</b>					
373 ±	01235-L00773	SNAP29	AGGAGCAAGATG-ACATTCTTGACC	19.572 kb	107 kb
418 ±	01521-L00951	LZTR1	ATGATGAAGGAG-TTCGAGCGCCTC	19.679 kb	450 kb
<b>LCR22-D; termina la región comúnmente deletada de DiGeorge</b>					
308 *	13302-L15009	HIC2	GTTCCAGCAGAT-CTTGGACTTCAT	20.129 kb	250 kb
130	07529-L04870	PPIL2	GAAGAGCCCTCA-ACCAGTGCCACT	20.380 kb	273 kb
292 *~	13299-L14649	TOP3B	GAGACATGATAA-AATCCAGTCCTT	20.653 kb	1081 kb
<b>LCR22-E</b>					
261	08484-L09139	RTDR1	GGTGTGTCAATTT-TGACGTCAATCCC	21.734 kb	61 kb
215	08478-L17067	GNAZ	TCACCATCTGCT-TTCCCGAGTACA	21.795 kb	17 kb
454	08479-L08490	RTDR1	CTCCTTGGAGCT-TCCCATTAAACAT	21.813 kb	5 kb
342	05932-L04872	RAB36	AGCTGGATGCTT-GGACGCGCCGCT	21.818 kb	642 kb
<b>LCR22-F</b>					
220	05928-L07969	SMARCB1	CTTCGGGCAGAA-GCCCGTGAAGTT	22.459 kb	47 kb
400	05933-L05812	SMARCB1	CATCAGCACACG-GCTCCCACGGAG	22.506 kb	777 kb
<b>LCR22-G</b>					
166	08481-L08492	SNRPD3	CCGGTGAGGTAT-ATCGGGGGAAGC	23.284 kb	
<b>LCR22-H</b>					

†, ¥, \*, ~, ± see the notes below Table 1.

El 87% de las deleciones observadas en el Síndrome de DiGeorge se extienden desde LCR22-A a LCR22-D [363]. Este kit P250 DiGeorge contiene 14 sondas localizadas en esta región. El 8% se extiende desde LCR22-A a LCR22-B, mientras que el 2% inicia en LCR22-A y termina en LCR22-C. Finalmente, 2% de los casos inician desde un sitio entre LCR22 -A y LCR22-B y termina en LCR22-D.

### Región 22q13

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial (24 nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomero 22p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
445	01093-L00661	ARSA	GGAGGATCAGAT-CTCCGCTCGAGA	49.413 kb	94 kb
232	06787-L07383	SHANK3	ACCAACTGTGAT-CAGTGAGCTCAG	49.508 kb	~ 190 kb Al telomero q
Telomero 22q					

### Región 10p14 DGR2

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial (24 nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomere 10p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
267	01225-L09140	GATA3	GAGTGCCTCAAG-TACCAGGTGCC	8.141 kb	15 kb
301 *	07636-L07321	GATA3	AACAGCTCGTTT-AACCCGGCCGCC	8.156 kb	2433 kb
350	01232-L17068	TCEB1P3	TGTAGACCACAT-GATGGAGATTTG	10.589 kb	428 kb
364	01234-L00781	CEL2 (CUGBP2)	GACATTCAGTGT-GGAAATTTGGTG	11.017 kb	230 kb
382	01522-L00952	CEL2 (CUGBP2)	TCCCCCGGTCAT-GGTCGAAAAGG	11.248 kb	9979 kb
487 ¥	08480-L15878	NEBL	CTGGGATCCTTT-TCTGTTCACTCA	21.226 kb	

### Región 8p23

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial (24 nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomere 8p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
472	01243-L07392	PPP1R3B	ACCGAGCTCCTA-GACAACATTGTG	9.036 kb	1067 kb
427	01240-L00787	MSRA	GCAACAGAACAG-TCGAACCTTTCC	10.103 kb	1551 kb
274	01226-L03844	GATA4	TGGATTTTCTCA-GATGCCTTTACA	11.654 kb	

### Región 4q34-qter

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial (24 nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomere 4p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
326 *	12093-L15011	SLC25A4	CATCAAGATCTT-CAAGTCTGATGG	186.303 kb	1087 kb
184	01217-L00694	KLKB1	ATGCCCAATACT-GCCAGATGAGGT	187.390 kb	3880 kb Al telomero 4q
Telomero 4q					

### Región 9q34.3

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial (24nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomere 9p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
136	05059-L07380	<i>EHMT1</i>	AAATGCTGCAAA-GCACACTCAGGA	139.731 kb	74 kb
154	05058-L07382	<i>EHMT1</i>	GGACCCCGTTGA-TGGAAGCAGCCG	139.805 kb	~ 465 kb to 9q telomere

9q telomere

### Región 17p13.3

Tamaño (nt)	Código de sonda MLPA	Gen	Secuencia Parcial (24nt adyacente al sitio de ligamiento)	Distancia al telomere 17p en kb (HG18)	Distancia a la sig. sonda
La distancia desde el telomero 17p hasta la primer sonda <i>RPH3AL</i> es aproximadamente 169 kb.					
255	01735-L07385	<i>RPH3AL</i>	AGGCGGAATGTG- ATGGGAACGGC	169 kb	14 kb
436	04081-L03465	<i>RPH3AL</i>	GTAGTGGACACT- TGTACGTGCACT	184 kb	413 kb
409	01238-L07390	<i>GEMIN4</i>	AAACAGTGATAG- ACGTCAGCACAG	597 kb	691 kb
391 *	13603-L03531	<i>YWHAE</i>	GCCACAGGAAAC-GACAGGAAGGAG	1.211 kb	

## 6.4 PROTOCOLO PARA LAS REACCIONES DE MLPA

### I. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Preparar diluciones de ADN en el buffer TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH=8.4):

- a. Sangre periférica 20ng/uL en 100 uL de TE
- b. Mucosa oral 20 ng/uL en 50 uL de TE

NOTA: No usar H<sub>2</sub>O para as diluciones por el riesgo de depurinación durante la desnaturalización, ya que afecta la ligación.

### II. DESNATURALIZACIÓN DE ADN (Dia 1):

- a. 5uL de ADN (20ng/uL) en tiras de PCR (alternativamente en placa de 48) para un total de 100 ng por reacción.
- b. Desnaturalizar a 98°C/5 min y enfriar a 25°C (programa “1\_DESNAT” en el termociclador de Bio-Rad)

### III. HIBRIDACION DE ADN (Dia 1):

- a. Homogeneizar por vortexeo las soluciones “MLPA probemix” y “MLPA buffer”
- b. Preparar el Master Mix de Hibridación (siempre adicionar un 10% por el error de pipeteo, p. ej: para 50 muestras reales hay que preparar mix como si fueran 53):

Reactivo	Identificacion	Volumen, $\mu$ L	19
		1xn	21
MLPA buffer	tapa amarilla	1.5	31.5
MLPA probemix	tapa negra	1.5	31.5

- c. Homogeneizar el MMH por vortexeo.
- d. Tomar 3 uL del MMH para adicionar a cada una de las muestras desnaturalizadas.
- e. Someter a una incubación a 95°C/1 min y luego a 60°C/16-20 horas (programa “2\_HY\_LIG” en el termociclador de Bio-Rad). Verificar el tiempo de incubación, ya que en el programa “2\_HY\_LIG” se establece tiempo indefinido para este paso.

**NOTA:** Si se utiliza el termociclador de la primer mesa, es necesario conectarlo a la fuente de poder para evitar que se apague si se va la luz.

#### IV. REACCIÓN DE LIGACIÓN (Día 2):

- a. Homogeneizar los dos buffers de Ligasa por vortexeo

NOTA: NO VORTEXEAR a la LIGASA misma, este procedimiento la inhibe.

- b. Preparar el Master Mix de Ligación (adicionar un 10% por el error de pipeteo):

Reactivo	Identificación	Volumen, uL	36
		1 rxn	38
dH2O	-	25	950
Ligasa buffer A	tapa transparente	3	114
Ligasa buffer B	tapa blanca	3	114
Ligasa-65	tapa verde	1	38
		32	1216

- c. Homogeneizar suavemente el MML por **pipeteo**, NO VORTEX!!!
- d. La incubación de las muestras a 60°C dentro del programa “2\_HY\_LIG” no se detiene, hay que brincar al siguiente paso apretando el botón de “Skip”. Es el paso de incubación a 54°C por tiempo indefinido.

- e. Cuando las muestras estén a 54°C, añadir a cada una 32 uL del MML, mezclar suavemente por pipeteo con la misma punta (pero puntas diferentes para cada muestra, por supuesto).
- f. Nuevamente apretar el botón de “Skip” y continuar la incubación a 54°C/15 min, luego inactivar la enzima a 98°C/5 min y detener la reacción a 20°C (todos los pasos están definidos en el programa “2\_HY\_LIG”).
- g. Quitar los tubos de PCR del termociclador y guardar a 4°C (pueden preservarse en estas condiciones hasta una semana)

V. REACCIÓN DE PCR (Dia 2):

- a. Homogeneizar el SALSA PCR primer mix por vortexeo.
- b. Precalear en las manos a la polimerasa durante 10 min.
- c. Preparar el Master Mix de PCR (adicionar un 5% por el error de pipeteo):

Reactivo	Identificacion	Volumen, uL	36
		<b>1 rxn</b>	<b>38</b>
dH2O	-	7.5	285
SALSA PCR primer mix	tapa café	2	76
SALSA Polymerase	tapa naranja	0.5	19
		10	380

- d. Homogeneizar suavemente el MMP por **pipeteo**, NO VORTEX!!! Mantener en el hielo hasta su uso.
- e. **A temperatura ambiente.** Tomar 10 uL de MMP y añadirlos a cada una de las muestras ligadas. Mezclar por pipeteo suave.
- f. Correr el siguiente programa de PCR (programa “3\_PCR” en termociclador del BioRad): (95°C/30s; 60°C/30s; 72°C/60s)\*35 ciclos; 72°C/20min; 15°C/tiempo indefinido

- g. Cubrir las reacciones con papel aluminio o meterlos en una caja oscura, guardar a 4°C hasta una semana o a -20°C por más tiempo.

VI. ELECTROFORESIS CAPILAR (Dia 3):

- a. Preparar el Mix de Corrida:

Reactivo	Volumen, uL	48	40
	1 rxn	40	44
Beckman D1-labeled CEQ size standard 600	0.15	6	6.6
Beckman Sample Loading Solution	32	1280	1408
	32.15	1286	1414.6

- b. Homogeneizar el MC por **pipeteo**.
- c. En la placa de electroforesis de 96 pozos poner 32.15 uL del MC para cada muestra.
- d. Añadir 0.7 uL de muestra, tomados con punta con filtro.
- e. Poner una gota de aceite mineral en cada muestra (Beckman).
- f. Correr las muestras en el equipo de electroforesis bajo las siguientes condiciones:

Temperatura del capilar 50°C; desnaturalización: 90°C por 120 s; voltaje de inyección: 1.6kV; tiempo de inyección 30 s; tiempo de corrida: 60 min a 4.8 kV.

## 6.5 PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN DE SANGRE TOTAL

1. Homogeneizar la muestra de sangre contenida en el tubo de recolección (Vacutainer con EDTA tapón morado de 4ml)
2. Transferir 700 ul de sangre a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y adicionar 700 ul de TTS (La muestra completa será repartida aproximadamente en 4 tubos de 1.5 ml)
3. Homogeneizar y centrifugar a 14 000 rpm/ 2 min. Decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón en 1 ml de TTS (homogeneizar con la punta de la pipeta)
5. Centrifugar a 14 000 rpm/2 min. Decantar el sobrenadante
6. Repetir el paso 5 y 6 3 veces más, se podrá observar un botón blanco o semitransparente
7. Resuspender el botón en 570 ul de NaCl 5 mM (homogeneizar con la punta de la pipeta)
8. Adicionar 30 ul de SDS al 10%. Homogeneizar durante 1 minuto en el vortex
9. Adicionar 200 ul de NaCl saturado. Homogeneizar perfectamente en el vortex
10. Centrifugar a 14000 rpm/ 10 min
11. Vaciar el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml nuevo y desechar el sedimento. Realizar un lavado con 500 ul de SEVAG
12. Agitar vigorosamente hasta que la solución se torne blanca. Centrifugar a 14000 rpm durante 6 min.





SDS 10%

Lauril Sulfato de Sodio 10 g

Aforar a 100 ml con agua bidestilada estéril

## 6.6 PROTOCOLO PARA PURIFICACIÓN DE ADN POR PRECIPITACIÓN EN ETANOL.

Preparar por cada 40-50ul de muestra lo siguiente:

Preparar la sol. de precipitación por cada 40-50 ul de ADN diluido (10 a 150 ng/ul) de la siguiente manera:

1/10 volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2/ volumen de la muestra

0.25 ul de Glicógeno 20 mg/ml (Roche) (la concentración de éste no cambia, es por muestra)

Mezclar vigorosamente por vortexeo.

NOTA: Preparar inmediatamente antes de procesar las muestras.

Para: 100 ul

Reactivo	Cantidad ul	Agregar	X2
		x2	
Acetato de Sodio 3 M pH 5.2	ul		
Glicogeno 20 mg/ml	ul		
<b>Total</b>	ul		

Transferir el ADN en un tubo de 0.6 ml

Añadir 10.25 ul por cada 100 ul a cada muestra de la sol de precipitación. Mezclar exhaustivamente por pipeteo.

Adicionar 2.5 volúmenes de etanol (por cada volumen de la muestra) al 95% a temperatura ambiente y mezclar por VORTEXEO.

Centrifugar inmediatamente a 14,000 rpm x 3 min.

Quitar el sobrenadante (quitar con pipeta).

Lavar el botón con 200 ul de etanol al 70% para cada muestra

Centrifugar a 14,000 rpm x 2 min.

Remover el sobrenadante y repetir el lavado (quitar el sobrenadante con una pipeta).

Secar al vacío 15 minutos.

Finalmente,

Resuspender en X ul de buffer TE de MLPA dependiendo de la concentración de la muestra.

**NOTA:** Si la muestra estaba muy diluida antes de la precipitación, hacer el cálculo del volumen para añadir tomando en cuenta que la concentración final debe ser mínimo 15 ng/uL.

## 6.7 ENCUESTA CLÍNICO GENÉTICA

### TÍTULO DEL PROTOCOLO:

“IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS CONOTRUNCAL AISLADAS Y ASOCIADAS A OTRAS MALFORMACIONES”

### ENCUESTA CLÍNICO-GENÉTICA

Datos Generales	
Institución: _____	Fecha: _____
Registro: _____	No. de Control *: _____
Entrevistador: _____	

### TRIO

1. Nombre del Paciente (Hijo): \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

2. Nombre de la Madre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

3. Nombre del Padre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Ocupación del propósito: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

Ocupación del padre: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

Ocupación de la madre: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

Domicilio actual: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Teléfono(s) casa: \_\_\_\_\_ Trabajo: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Otro contacto: \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

Edad paterna/materna al momento del embarazo: Paterna: \_\_\_\_\_ Materna: \_\_\_\_\_

Tipo de parto: Espontáneo/Cesárea/otro: \_\_\_\_\_

Al nacimiento: Peso (Kg): \_\_\_\_\_ Talla (m): \_\_\_\_\_ PC (cm): \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: DÍA: \_\_\_\_\_ MES: \_\_\_\_\_ AÑO: \_\_\_\_\_

Lugar de residencia antes / durante el embarazo: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Consanguinidad: \_\_\_\_\_

Complicaciones perinatales (Hipoxia neonatal/otras): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\* No. control: 0 / 000 / 0 = Institución: 1 INCIH, 2 INP / 001 Caso, 002 Control / 1 Propósito, 2 Madre, 3 Padre, 4 Hermano

**EXPOSICIÓN MATERNA PERICONCEPCIONAL DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE:**

<b>ENFERMEDAD MATERNA O FACTOR DE EXPOSICIÓN</b>	(Momento de exposición: trimestre, dosis, duración,...)
Diabetes pregestacional	
Diabetes gestacional	
Epilepsia	
Hipertensión Arterial	
Obesidad	
Rubéola materna	
Otra condición materna (especificar):	
<b>FARMACOLÓGICOS/DROGAS</b>	
<i>Multivitámínicos (TIPO)</i>	<input type="checkbox"/> 3 MESES ANTES DEL EMBARAZO <input type="checkbox"/> AL MOMENTO DEL EMBARAZO <input type="checkbox"/> ÁNTES Y DESPUÉS DEL EMBARAZO
<i>Ácido Fólico (elegir una opción)</i>	<input type="checkbox"/> 3 MESES ANTES DEL EMBARAZO <input type="checkbox"/> AL MOMENTO DEL EMBARAZO <input type="checkbox"/> ÁNTES Y DESPUÉS DEL EMBARAZO
<i>Anticonvulsivantes</i>	
<i>Trimetoprim/sulfametoxazol</i>	
<i>Anti-inflamatorio no esteroideo</i>	
Otros fármacos: especificar	
Drogas recreativas (alcohol, marihuana, cocaína, etc)	
Tabaquismo:	
Alcoholismo:	

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**TIPO Y DESCRIPCIÓN DE LA CARDIOPATÍA**

EDAD AL DIAGNÓSTICO DE LA CARDIOPATÍA: \_\_\_\_\_

- TETRALOGÍA DE FALLOT                       TRONCO ARTERIOSO
- TRANSPOSICIÓN DE GRANDES VASOS       DOBLE SALIDA DEL VENTRÍCULO DERECHO
- COMUNICACIÓN INTERVENTRICULAR PERIMEMBRANOSA
- COMUNICACIÓN INTERINFUNDIBULAR SUBAÓRTICA
- INTERRUPCIÓN DEL ARCO AÓRTICO TIPO B

DESCRIPCIÓN COMPLEMENTARIA:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**MUESTRAS OBTENIDAS:**

	SANGRE PERIFÉRICA (TUBOS)	MUCOSA ORAL
<b>PACIENTE:</b>		
<b>PADRE:</b>		
<b>MADRE:</b>		
<b>OTROS FAM:</b>		

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**PROTOKOLO: IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS  
CON TRUNCALAS AISLADAS Y ASOCIADAS A OTRAS MALFORMACIONES  
SÍNDROME POR MICRODELECIÓN 22q11.2**

**CARDIOPATÍA CONGÉNITA (especialmente conotruncal)**

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Comunicación interventricular (CIV) | <input type="checkbox"/> Arco aórtico interrumpido tipo B      |
| <input type="checkbox"/> Comunicación interauricular (CIA)   | <input type="checkbox"/> Coartación de aorta                   |
| <input type="checkbox"/> Atresia pulmonar o estenosis        | <input type="checkbox"/> Anomalías de la válvula aórtica       |
| <input type="checkbox"/> Tetralogía de Fallot                | <input type="checkbox"/> Arterias subclavas aberrantes         |
| <input type="checkbox"/> Aorta del lado derecho              | <input type="checkbox"/> Anillo vascular                       |
| <input type="checkbox"/> Tronco arterial                     | <input type="checkbox"/> Origen anormal de la arteria carótida |
| <input type="checkbox"/> Persistencia del conducto arterioso | <input type="checkbox"/> Transposición de grandes vasos        |

**PALADAR ANORMAL**  Paladar hendido submucoso

**HIPOCALCEMIA**

**DEFICIENCIA INMUNE**

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Células T disminuidas                               | <input type="checkbox"/> Hormona tiroica disminuida                          |
| <input type="checkbox"/> Infecciones de vías respiratorias altas recurrentes | <input type="checkbox"/> Infecciones de vías respiratorias bajas recurrentes |

**PROBLEMAS COGNITIVOS / APRENDIZAJE**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Dificultades de aprendizaje (matemáticas y comprensión de lectura - común) | <input type="checkbox"/> Caída del CI en los años escolares                 |
| <input type="checkbox"/> Deficiencia del pensamiento concreto y funciones ejecutivas                | <input type="checkbox"/> CI bajo (60-80), puede ser mayor o menor           |
|   | <input type="checkbox"/> Desorden de hiperactividad con déficit de atención |

**FASCIES CARACTERÍSTICA**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fascias alargadas | <input type="checkbox"/> Asimetría facial / llanto asimétrico |
| <input type="checkbox"/> Hipotónica        | <input type="checkbox"/> Perfil facial plano                  |
| <input type="checkbox"/> Retrognatia       | <input type="checkbox"/> Comensuras orales hacia abajo        |

**Cráneo**

- Microcefalia
- Plitibasia
- Fosa craneal posterior pequeña

**Cavidad oral**

- Ausencia congénita de piezas dentales
- Dientes pequeños (dentición primaria)
- Hipoplasia del esmalte con caries grave (dentición primaria)
- Labio hendido (poco común)

**Pabellones auriculares**

- Hélices sobre enrollados
- Lóbulos adheridos
- Orejas acopadas, protuberantes
- Orejas pequeñas
- Oídos moderadamente asimétricos
- Otitis media recurrente
- Sordera neurosensorial (unilateral)
- Fositas o apéndices auriculares (Raro)
- Canal auditivo externo estrecho

**Alteraciones oftalmológicas**

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Vasos retinales tortuosos   | <input type="checkbox"/> Disco óptico pequeño                            |
| <input type="checkbox"/> Congestión sub-orbital      | <input type="checkbox"/> Nervios corneales prominentes                   |
| <input type="checkbox"/> Ptosis                      | <input type="checkbox"/> Nódulos en iris                                 |
| <input type="checkbox"/> Embrioloxon posterior       | <input type="checkbox"/> Ojos pequeños                                   |
| <input type="checkbox"/> Esclerocomea                | <input type="checkbox"/> Hiperelotropismo moderado orbital               |
| <input type="checkbox"/> Coloboma                    | <input type="checkbox"/> Coloboma del lms (raro)                         |
| <input type="checkbox"/> Catarata                    | <input type="checkbox"/> Coloboma de la retina (raro)                    |
| <input type="checkbox"/> Estrabismo                  | <input type="checkbox"/> Pliegues redundantes en los párpados superiores |
| <input type="checkbox"/> Fisuras papilares estrechas | <input type="checkbox"/> Distopia orbital moderada vertical              |

**Alteraciones vasculares**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Desplazamiento medial de las arterias carótidas | <input type="checkbox"/> Ausencia de carótida interna (unilateral)  |
| <input type="checkbox"/> Carótida interna tortuosa o retorcida           | <input type="checkbox"/> Ausencia de arteria vertebral (unilateral) |
| <input type="checkbox"/> Alteración de las venas yugulares               | <input type="checkbox"/> Bifurcación baja de la carótida común      |
| <input type="checkbox"/> Fenómeno de Raynaud                             | <input type="checkbox"/> Anomalías del polígono de Willis           |

**Neurologico y Sistema Nervioso Central:**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Hipotonía generalizada                      | <input type="checkbox"/> Volumen total del cerebro disminuido                     |
| <input type="checkbox"/> Ataxia cerebelar                            | <input type="checkbox"/> Quistes periventriculares                                |
| <input type="checkbox"/> Convulsiones                                | <input type="checkbox"/> Hipoplasia/Digénesis cerebelar                           |
| <input type="checkbox"/> Accidente vascular cerebral                 | <input type="checkbox"/> Hipertensidades en materia blanca                        |
| <input type="checkbox"/> Espina bifida / mielomeningocele            | <input type="checkbox"/> Fisuras sálicas agrandadas                               |
| <input type="checkbox"/> Retraso moderado del desarrollo psicomotriz | <input type="checkbox"/> Compresión del cordón espinal                            |
| <input type="checkbox"/> Septum pellucidum cavum                     | <input type="checkbox"/> Variaciones en el tamaño de varios segmentos del cerebro |
| <input type="checkbox"/> Polimicrogria                               |   |

**Alteraciones psiquiátricas / psicológicas**

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Desorden bipolar                        | <input type="checkbox"/> Depresión / distimia / ciclotimia |
| <input type="checkbox"/> Psicosis / enfermedad maniaco depresiva | <input type="checkbox"/> Desorden del espectro autista     |
| <input type="checkbox"/> Esquizofrenia                           | <input type="checkbox"/> Desorden esquizoafectivo          |

**Alteraciones del lenguaje**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Insuficiencia Velofaríngea (grave) | <input type="checkbox"/> Defecto del lenguaje (moderado)                    |
| <input type="checkbox"/> Hiperalsaladía importante          | <input type="checkbox"/> Problemas de articulación graves (oclusión glotal) |
| <input type="checkbox"/> Tono de voz agudo                  |   |
| <input type="checkbox"/> Voz ronca, ronquera, carraspera    |   |

**Alteraciones esqueléticas**

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Braquidactilia                             | <input type="checkbox"/> Contracturas (raro)                         |
| <input type="checkbox"/> Polidactilia preaxial o postaxial de manos | <input type="checkbox"/> Pulgar Infantilco (raro)                    |
| <input type="checkbox"/> Polidactilia postaxial de pies             | <input type="checkbox"/> Sindactilia de tejidos blandos (raro)       |
| <input type="checkbox"/> Falanges cónicas                           | <input type="checkbox"/> Costillas supernumerarias                   |
| <input type="checkbox"/> Uñas cortas                                | <input type="checkbox"/> Fusión de costillas                         |
| <input type="checkbox"/> Escoliosis                                 | <input type="checkbox"/> Hemivertebras                               |
| <input type="checkbox"/> Osteopenia                                 | <input type="checkbox"/> Anomalia de Sprengel, deformación escapular |
| <input type="checkbox"/> Pie plano                                  | <input type="checkbox"/> Pie equino varo                             |
| <input type="checkbox"/> Dislocación de articulaciones              | <input type="checkbox"/> Hiperartitud articular                      |
| <input type="checkbox"/> Dolor de piernas crónico                   |  |

**Alteraciones de vías aéreas / faríngeas / laringeas**

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Obstrucción aérea superior en la infancia | <input type="checkbox"/> Hiperplasia del antenoides                  |
| <input type="checkbox"/> Adenoides pequeñas o ausentes             | <input type="checkbox"/> Hipotonía faríngea                          |
| <input type="checkbox"/> Membranas laringeas (anterior)            | <input type="checkbox"/> Movimiento faríngeo asimétrico              |
| <input type="checkbox"/> Laringomalacia                            | <input type="checkbox"/> Parálisis de cuerdas faríngeas (unilateral) |
| <input type="checkbox"/> Restricción al flujo de aire / asma       | <input type="checkbox"/> Faringe asimétrica                          |
| <input type="checkbox"/> Musculatura faríngea delgada              | <input type="checkbox"/> Laringe asimétrica                          |
| <input type="checkbox"/> Vías faríngeas grandes                    |  |

**Alteraciones abdominales / renales**

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Aplasia / Hipoplasia renal | <input type="checkbox"/> Malrotación intestinal (raro) |
| <input type="checkbox"/> Quistes renales            | <input type="checkbox"/> Diastasis de rectos           |
| <input type="checkbox"/> Hernia inguinal            | <input type="checkbox"/> Hernia diafragmática          |
| <input type="checkbox"/> Hernia umbilical           |  |

**Alteraciones genitourinarias**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Hipospadias                              | <input type="checkbox"/> Agenesia renal         |
| <input type="checkbox"/> Criptorquidea                            | <input type="checkbox"/> Reflujo vesicoureteral |
| <input type="checkbox"/> Riñón poliquístico, duplicado, herradura | <input type="checkbox"/> Hidrocele              |

**Alteraciones endocrinas**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Hipoparatiroidismo    | <input type="checkbox"/> Glandula pituitaria pequeña (raro) |
| <input type="checkbox"/> Hipotiroidismo        | <input type="checkbox"/> Timo hipoplásico / ausente         |
| <input type="checkbox"/> Tiroiditis autoinmune |   |

**Neoplasias**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Hepatoblastoma,               | <input type="checkbox"/> Tumor de Wilms |
| <input type="checkbox"/> Carcinoma de células renales, | <input type="checkbox"/> Neuroblastoma  |

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRAN

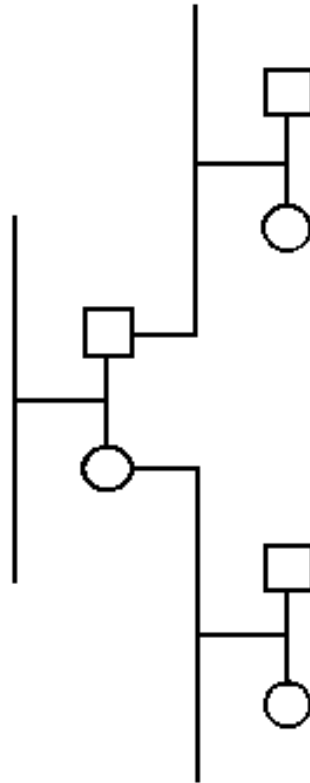
DEPARTAMENTO DE GENETICA

Genealogía de:

Registro:

Fecha:

- Líneas de:**
- Mujer Sana
  - Hombre Sano
  - Propósito
  - Sexo Desconocido o Indeterminado
  - Aborto
  - Hombres y Mujeres Sanos
  - Unión Reproductiva
  - Unión Consanguínea
  - Hermandad
  - Sin Descendencia





## 6.8 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por este medio expreso que se me ha invitado a participar a mi hijo(a) y a nosotros (madre y padre del menor) en el estudio de investigación titulado:

### “IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS (CNVs) EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS CONOTRUNCAL AISLADAS Y ASOCIADAS A OTRAS MALFORMACIONES”

Se me ha explicado en forma clara que en este estudio se investigarán variantes genéticas probablemente relacionadas a las cardiopatías congénitas, con la finalidad de obtener información que permita conocer la frecuencia y el tipo de estas variantes genéticas en una muestra de niños con cardiopatías conotruncales (tetralogía de Fallot, tronco arterioso, transposición de grandes vasos, doble salida del ventrículo derecho y algunos tipos de estenosis pulmonar y de comunicación interventricular) y sus padres, así como de dos grupos de comparación, uno conformado por niños con el mismo tipo de cardiopatía más otras malformaciones congénitas y otro grupo conformado por sujetos sanos.

Así mismo, manifiesto que estoy en conocimiento de que toda la información obtenida será confidencial y sólo podrá ser utilizada para fines de investigación, manteniéndose anónima la identidad de mi hijo(a) y la de nosotros (madre y padre del menor). También se me ha informado que nuestra participación es voluntaria y podremos negarnos a la misma en el momento que así lo deseáramos, lo que no repercutirá en forma alguna en el tratamiento y seguimiento de mi hijo(a) en el Instituto.

Estoy de acuerdo en proporcionar la información sobre nuestros antecedentes clínicos así como una muestra de aproximadamente 8ml de sangre venosa de mi hijo(a) y muestra de sangre o células de mucosa oral de nosotros (madre y padre del menor). Soy consciente de que este procedimiento no pone en peligro la vida o salud de mi hijo.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado y en pleno uso de mis facultades mentales, acepto participar en este proyecto de investigación.

**PACIENTE**

**MÉDICO INFORMANTE**

**TESTIGO**

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma*

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma*

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma*

**PADRE O TUTOR**

**MADRE O TUTOR**

**TESTIGO**

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma*  
*Nombre y firma*

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma*

México, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

**Médico Responsable: Dr. Juan E. Calderón Colmenero, Subjefe del Servicio de Cardiología Pediátrica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".**

**Médico titular del proyecto: Dra. Jazmín Arteaga Vázquez, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Tel. 54870900 ext. 2520**

## HOJA DE INFORME PARA PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Las cardiopatías congénitas constituyen el 20% de todas las malformaciones congénitas observadas en recién nacidos vivos. En México cada año nacen aproximadamente 28,000 niños con esta malformación y una proporción considerable de estos niños carece de un diagnóstico y tratamiento oportunos. En algunas familias se puede observar la presencia de cardiopatía congénita en más de un familiar y en nuestro país poco se sabe respecto al riesgo de repetición de esta malformación. Las cardiopatías conotruncuales (tetralogía de Fallot, tronco arterioso, transposición de grandes vasos, doble salida del ventrículo derecho y algunos tipos de estenosis pulmonar y de comunicación interventricular) como la que presenta su hijo(a), representan la cuarta parte de todas las cardiopatías congénitas. Estas malformaciones se originan por un defecto en la tabicación de los grandes vasos del corazón durante las primeras semanas del embarazo.

Algunos investigadores han encontrado que cambios en el material genético que dan origen a variantes genéticas se relacionan a ciertos tipos de cardiopatías conotruncuales. El protocolo de investigación titulado: **“IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS (CNVs) EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS CONOTRUNCALAS AISLADAS Y ASOCIADAS A OTRAS MALFORMACIONES”** tiene como objetivo principal conocer la frecuencia y el tipo de ciertas variantes genéticas que pudieran estar relacionadas con malformaciones cardiacas en una muestra de niños con cardiopatías conotruncuales y sus padres, así como de dos grupos de comparación, uno conformado por niños con el mismo tipo de cardiopatías más otras malformaciones y otro grupo conformado por sujetos sanos.

Los resultados obtenidos de esta investigación servirán para entender mejor el origen de las cardiopatías conotruncuales, identificar variantes genéticas que pudieran estar asociadas a estas malformaciones y profundizar en el conocimiento que tenemos sobre el riesgo de repetición en las familias.

Si usted desea que su hijo(a) participe en este estudio la colaboración consistirá en: 1) realización de una encuesta clínico-genética para obtener información referente a enfermedades en la familia, 2) toma de 8ml de sangre periférica mediante punción venosa para extracción de DNA y 3) la obtención de una muestra de sangre de ambos padres, similar a la obtenida para su hijo(a), o de células de mucosa oral. En estas muestras analizaremos variantes genéticas relacionadas con cardiopatías congénitas. La encuesta y la toma de las muestras se realizarán el mismo día y no requerirá de citas posteriores.

Es importante aclararle que ninguno de estos procedimientos pone en riesgo la vida, la salud o la **confidencialidad** de los datos de su hijo(a) y resto de la familia, que ninguno de los procedimientos tendrá costo alguno para usted y que la participación en el proyecto es GRATUITA, VOLUNTARIA, CONFIDENCIAL y NO CONDICIONADA. Su familia podrá abandonar este estudio en el momento que así lo considere y no tendrá repercusión alguna en el seguimiento y/o tratamiento de su hijo(a).

Gracias por su atención, atentamente:

**Médico Responsable: Dr. Juan E. Calderón Colmenero,  
Subjefe del Servicio de Cardiología Pediátrica,  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".**

**Médico titular del proyecto: Dra. Jazmín Arteaga Vázquez, Departamento de Genética,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Tel. 54870900 ext.  
2520**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Van Praagh R. *The First Stella Van Praagh Memorial Lecture: The History and Anatomy of Tetralogy of Fallot*. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery: Pediatric Cardiac Surgery Annual, 2009. 12(1): 19-38.
2. Sandifort E. *Observationes anatomico-pathologicae*. Caput Primum, 1777: 1-38.
3. Hunter J. *Three cases of mal-conformation in the heart*. Medical Observations and Inquires, 1784. 6: 291-294.
4. Farre J. *Essay I. On the malformations of the heart*. Pathological Researches, 1814: 1-46.
5. Peacock TB. *On Malformations of the human heart*. John Churchill, London, 1858: 28-46.
6. Fallot A. *Contribution a l'anatomie pathologique de la maladie bleue (cyanose cardiaque)*. Marseille Med, 1888. 25: 77-93.
7. Abbott ME, Dawson WT. *The clinical classification of congenital cardiac disease, with remarks upon its pathological anatomy, diagnosis and treatment*. Int Clin, 1924. 4: 156-188.
8. van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW. *Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2011. 58(21): 2241-7.
9. Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. *Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history*. Circulation, 1971. 43(3): 323-32.
10. Hoffman JI. *Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence*. Pediatr Cardiol, 1995. 16(4): 155-65.
11. Schmitt JP, Seidman CE, *chapter 14 - Monogenic Causes of Congenital Heart Disease*, in *Molecular Basis of Cardiovascular Disease (Second Edition)*, C. Kenneth R, Md, and M.D.P. PhDa2 - Kenneth R. Chien, Editors. 2004, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 261-271.

12. Srivastava D, Olson EN, *chapter 10 - Cardiac Development and Congenital Heart Disease*, in *Molecular Basis of Cardiovascular Disease (Second Edition)*, C. Kenneth R, Md, and M.D.P. PhDa2 - Kenneth R. Chien, Editors. 2004, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 217-224.
13. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, Shin M, Correa A. *The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study*. *Pediatr Cardiol*, 2011. 32(8): 1147-57.
14. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. *Genetics of congenital heart disease: the glass half empty*. *Circ Res*, 2013. 112(4): 707-20.
15. Mordi I, Tzemos N. *Bicuspid aortic valve disease: a comprehensive review*. *Cardiol Res Pract*, 2012. 2012: 196037.
16. Hoffman JIE, Kaplan S. *The incidence of congenital heart disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002. 39(12): 1890-1900.
17. Bernier PL, Stefanescu A, Samoukovic G, Tchervenkov CI. *The challenge of congenital heart disease worldwide: Epidemiologic and demographic facts*. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery: Pediatric Cardiac Surgery Annual*, 2010. 13(1): 26-34.
18. van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJ. *The changing epidemiology of congenital heart disease*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. 8(1): 50-60.
19. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Jr., Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, McGee G, Sable CA, Srivastava D, Webb CL, American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee CoCDitY. *Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics*. *Circulation*, 2007. 115(23): 3015-38.
20. Gilboa SM, Salemi JL, Nembhard WN, Fixler DE, Correa A. *Mortality resulting from congenital heart disease among children and adults in the United States, 1999 to 2006*. *Circulation*, 2010. 122(22): 2254-2263.

21. Botto LD, Correa A, Erickson JD. *Racial and Temporal Variations in the Prevalence of Heart Defects*. Pediatrics, 2001. 107(3): e32.
22. Bjornard K, Riehle-Colarusso T, Gilboa SM, Correa A. *Patterns in the prevalence of congenital heart defects, metropolitan Atlanta, 1978 to 2005*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2013. 97(2): 87-94.
23. Dolk H, Loane M, Garne E. *Congenital heart defects in Europe: Prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005*. Circulation, 2011. 123(8): 841-849.
24. Nembhard WN, Salemi JL, Wang T, Loscalzo ML, Hauser KW. *Is the prevalence of specific types of congenital heart defects different for non-Hispanic white, non-Hispanic black and Hispanic infants?* Matern Child Health J, 2010. 14(2): 184-93.
25. Calderón-Colmenero J, Cervantes-Salazar JL, Curi-Curi PJ, Ramírez-Marroquin S. *Problemática de las cardiopatías congénitas en México. Propuesta de regionalización*. Arch Cardiol Mex, 2010. 80(2): 133-140.
26. Fernández-Cantón SB, Gutiérrez-Trujillo G, Viguri-Urbe R. *Principales causas de mortalidad infantil en México: tendencias recientes*. Bol Med Hosp Infant Mex, 2012. 69(2): 144-148.
27. Apitz C, Webb GD, Redington AN. *Tetralogy of Fallot*. Lancet, 2009. 374(9699): 1462-71.
28. Bailliard F, Anderson RH. *Tetralogy of Fallot*. Orphanet J Rare Dis, 2009. 4: 2.
29. Starr JP. *Tetralogy of fallot: yesterday and today*. World J Surg, 2010. 34(4): 658-68.
30. Johnson TR. *Conotruncal cardiac defects: a clinical imaging perspective*. Pediatr Cardiol, 2010. 31(3): 430-7.
31. Marino B, Digilio MC. *Congenital heart disease and genetic syndromes: specific correlation between cardiac phenotype and genotype*. Cardiovasc Pathol, 2000. 9(6): 303-15.
32. Kalra N, Klewer SE, Raasch H, Sorrell VL. *Update on tetralogy of Fallot for the adult cardiologist including a brief historical and surgical perspective*. Congenit Heart Dis, 2010. 5(3): 208-19.

33. Somerville J. *The Denolin Lecture: The woman with congenital heart disease*. Eur Heart J, 1998. 19(12): 1766-75.
34. Engelfriet P, Mulder BJ. *Gender differences in adult congenital heart disease*. Neth Heart J, 2009. 17(11): 414-7.
35. Sarikouch S, Boethig D, Beerbaum P. *Gender-specific algorithms recommended for patients with congenital heart defects: review of the literature*. Thorac Cardiovasc Surg, 2013. 61(1): 79-84.
36. Kouchoukos NT, Blackstone EH, Doty DB, Hanley FL, Karp RB. *Ventricular septal defect with pulmonary stenosis or atresia*. Kirklin/Barratt-Boyes Cardiac Surgery, 2003: 946-1073.
37. Loh TF, Ang YH, Wong YK, Tan HY. *Fallot's tetralogy: Natural history*. Singapore Medical Journal, 1973. 14(3): 169-171.
38. Moorman AFM, Christoffels VM. *Cardiac chamber formation: Development, genes, and evolution*. Physiological Reviews, 2003. 83(4): 1223-1267.
39. Rana MS, Christoffels VM, Moorman AF. *A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis*. Acta Physiol (Oxf), 2013. 207(4): 588-615.
40. Van Den Berg G, Moorman AFM. *Concepts of Cardiac Development in Retrospect*. Pediatric Cardiology, 2009. 30(5): 580-587.
41. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. *The Arterial Pole of the Mouse Heart Forms from Fgf10-Expressing Cells in Pharyngeal Mesoderm*. Developmental Cell, 2001. 1(3): 435-440.
42. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. *The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field*. Developmental Biology, 2001. 238(1): 97-109.
43. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. *Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field*. Development, 2001. 128(16): 3179-3188.
44. Rana MS, Horsten NCA, Tesink-Taekema S, Lamers WH, Moorman AFM, Van Den Hoff MJB. *Trabeculated right ventricular free wall in the chicken*

- heart forms by ventricularization of the myocardium initially forming the outflow tract.* Circulation Research, 2007. 100(7): 1000-1007.
45. Kelly RG. *The Second Heart Field.* Current Topics in Developmental Biology, 2012. 100: 33-65.
  46. Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AFM. *Development of the pacemaker tissues of the heart.* Circulation Research, 2010. 106(2): 240-254.
  47. Srivastava D, Olson EN. *A genetic blueprint for cardiac development.* Nature, 2000. 407(6801): 221-226.
  48. Harvey RP. *Patterning the vertebrate heart.* Nature Reviews Genetics, 2002. 3(7): 544-556.
  49. Schoenwolf GC, Garcia-Martinez V. *Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos.* Cellular and Molecular Biology Research, 1995. 41(4): 233-240.
  50. Tam PPL, Parameswaran M, Kinder SJ, Weinberger RP. *The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: The role of ingression and tissue movement during gastrulation.* Development, 1997. 124(9): 1631-1642.
  51. Arnold SJ, Huang GJ, Cheung AFP, Era T, Nishikawa SI, Bikoff EK, Molnár Z, Robertson EJ, Groszer M. *The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone.* Genes and Development, 2008. 22(18): 2479-2484.
  52. Costello I, Pimeisl IM, Dräger S, Bikoff EK, Robertson EJ, Arnold SJ. *The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation.* Nature Cell Biology, 2011. 13(9): 1084-1092.
  53. Kitajima S, Takagi A, Inoue T, Saga Y. *MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm.* Development, 2000. 127(15): 3215-3226.

54. Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. *Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2000. 10(8): 345-352.
55. Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyba M, Blanpain C. *Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification*. Cell Stem Cell, 2008. 3(1): 69-84.
56. Bondue A, Blanpain C. *Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment*. Circulation Research, 2010. 107(12): 1414-1427.
57. David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Müller-Höcker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM. *MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling*. Nature Cell Biology, 2008. 10(3): 338-345.
58. Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, Langer EM, Cai M, Mashayekhi M, Wang W, Niwa N, Nerbonne JM, Kyba M, Murphy KM. *Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs*. Cell Stem Cell, 2008. 3(1): 55-68.
59. Arai A, Yamamoto K, Toyama J. *Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation*. Developmental Dynamics, 1997. 210(3): 344-353.
60. López-Sánchez C, García-Martínez V. *Molecular determinants of cardiac specification*. Cardiovascular Research, 2011. 91(2): 185-195.
61. Abu-Issa R, Kirby ML. *Patterning of the heart field in the chick*. Developmental Biology, 2008. 319(2): 223-233.
62. Schultheiss TM, Burch JBE, Lassar AB. *A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis*. Genes and Development, 1997. 11(4): 451-462.
63. Andrée B, Duprez D, Vorbusch B, Arnold HH, Brand T. *BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos*. Mechanisms of Development, 1998. 70(1-2): 119-131.



64. Alsan BH, Schultheiss TM. *Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling*. *Development*, 2002. 129(8): 1935-1943.
65. Pandur P, Läsche M, Eisenberg LM, Kühl M. *Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis*. *Nature*, 2002. 418(6898): 636-641.
66. Bergmann MW. *WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: Lessons learned from cardiac development*. *Circulation Research*, 2010. 107(10): 1198-1208.
67. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. *Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm*. *Genes and Development*, 2001. 15(3): 316-327.
68. Schneider VA, Mercola M. *Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis*. *Genes and Development*, 2001. 15(3): 304-315.
69. Foley A, Mercola M. *Heart induction: Embryology to cardiomyocyte regeneration*. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2004. 14(3): 121-125.
70. Logan CY, Nusse R. *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004. 20: 781-810.
71. Bakker ML, Christoffels VM, Moorman AFM. *The cardiac pacemaker and conduction system develops from embryonic myocardium that retains its primitive phenotype*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2010. 56(1): 6-15.
72. Lickert H, Kutsch S, Kanzler B, Tamai Y, Taketo MM, Kemler R. *Formation of multiple hearts in mice following deletion of  $\beta$ -catenin in the embryonic endoderm*. *Developmental Cell*, 2002. 3(2): 171-181.
73. Foley AC, Mercola M. *Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex*. *Genes and Development*, 2005. 19(3): 387-396.
74. Tzahor E, Lassar AB. *Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis*. *Genes and Development*, 2001. 15(3): 255-260.

75. Alexandrovich A, Arno M, Patient RK, Shah AM, Pizzey JA, Brewer AC. *Wnt2 is a direct downstream target of GATA6 during early cardiogenesis*. Mechanisms of Development, 2006. 123(4): 297-311.
76. Onizuka T, Yuasa S, Kusumoto D, Shimoji K, Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K. *Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2012. 52(3): 650-659.
77. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. *Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells*. Nature Reviews Genetics, 2005. 6(11): 826-835.
78. Sizarov A, Ya J, De Boer BA, Lamers WH, Christoffels VM, Moorman AFM. *Formation of the building plan of the human heart: Morphogenesis, growth, and differentiation*. Circulation, 2011. 123(10): 1125-1135.
79. Varner VD, Taber LA. *Not just inductive: A crucial mechanical role for the endoderm during heart tube assembly*. Development, 2012. 139(9): 1680-1690.
80. DeRuiter MC, Poelmann RE, Van Der Plas-De Vries I, Mentink MMT, Gittenberger-De Groot AC. *The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes?* Anatomy and Embryology, 1992. 185(5): 461-473.
81. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. *Nkx-2.5: A novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants*. Development, 1993. 119(2): 419-431.
82. Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB. *Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm*. Development, 1995. 121(12): 4203-4214.
83. Black BL. *Transcriptional pathways in second heart field development*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2007. 18(1): 67-76.

84. Tsuchihashi T, Maeda J, Shin CH, Ivey KN, Black BL, Olson EN, Yamagishi H, Srivastava D. *Hand2* function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis. *Developmental Biology*, 2011. 351(1): 62-69.
85. Bruneau BG. *The developmental genetics of congenital heart disease*. *Nature*, 2008. 451(7181): 943-948.
86. Virágh S, Challice CE. *Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse*. *Journal of Ultrastructure Research*, 1973. 42(1-2): 1-24.
87. Arguello C, De La Cruz MV, Gomez CS. *Experimental study of the formation of the heart tube in the chick embryo*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1975. 33(1): 1-11.
88. De La Cruz MV, Sanchez Gomez C, Arteaga MM, Arguello C. *Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo*. *Journal of Anatomy*, 1977. 123(3): 661-686.
89. Meilhac SM, Kelly RG, Rocancourt D, Eloy-Trinquet S, Nicolas JF, Buckingham ME. *A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart*. *Development*, 2003. 130(16): 3877-3889.
90. Kelly RG, Papaioannou VE. *Visualization of outflow tract development in the absence of *Tbx1* using an *Fgf10* enhancer trap transgene*. *Developmental Dynamics*, 2007. 236(3): 821-828.
91. Moorman AFM, Christoffels VM, Anderson RH, Van Den Hoff MJB. *The heart-forming fields: One or multiple?* *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007. 362(1484): 1257-1265.
92. Dyer LA, Kirby ML. *The role of secondary heart field in cardiac development*. *Developmental Biology*, 2009. 336(2): 137-144.
93. Soufan AT, Van Den Berg G, Ruijter JM, De Boer PAJ, Van Den Hoff MJB, Moorman AFM. *Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation*. *Circulation Research*, 2006. 99(5): 545-552.
94. Van Den Berg G, Abu-Issa R, De Boer BA, Hutson MR, De Boer PAJ, Soufan AT, Ruijter JM, Kirby ML, Van Den Hoff MJB, Moorman AFM. A

- caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube.* Circulation Research, 2009. 104(2): 179-188.
95. de Boer BA, van den Berg G, de Boer PAJ, Moorman AFM, Ruijter JM. *Growth of the developing mouse heart: An interactive qualitative and quantitative 3D atlas.* Developmental Biology, 2012. 368(2): 203-213.
  96. Hensen V. *Beobachtungen über die befruchtung und entwicklung des kaninchens und meerschweinchens.* Z. Anat. Entwgesch., 1876. 1: 353-423.
  97. Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S. *Nodal Flow and the Generation of Left-Right Asymmetry.* Cell, 2006. 125(1): 33-45.
  98. Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. *Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow.* Nature, 2002. 418(6893): 96-99.
  99. Zaffran S, Kelly RG. *New developments in the second heart field.* Differentiation, 2012. 84(1): 17-24.
  100. Christoffels VM, Mommersteeg MTM, Trowe MO, Prall OWJ, De Gier-De Vries C, Soufan AT, Bussen M, Schuster-Gossler K, Harvey RP, Moorman AFM, Kispert A. *Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18.* Circulation Research, 2006. 98(12): 1555-1563.
  101. Mommersteeg MTM, Domínguez JN, Wiese C, Norden J, De Gier-De Vries C, Burch JBE, Kispert A, Brown NA, Moorman AFM, Christoffels VM. *The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development.* Cardiovascular Research, 2010. 87(1): 92-101.
  102. Abu-Issa R, Kirby ML. *Heart field: From mesoderm to heart tube.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2007. 23: 45-68.
  103. Cui C, Chevront TJ, Lansford RD, Moreno-Rodriguez RA, Schultheiss TM, Rongish BJ. *Dynamic positional fate map of the primary heart-forming region.* Developmental Biology, 2009. 332(2): 212-222.
  104. Soriano P. *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [1].* Nature Genetics, 1999. 21(1): 70-71.

105. Doetschman T, Azhar M. *Cardiac-specific inducible and conditional gene targeting in mice*. *Circulation Research*, 2012. 110(11): 1498-1512.
106. Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. *Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system*. *Developmental Dynamics*, 2006. 235(2): 395-402.
107. Aanhaanen WTJ, Brons JF, Domínguez JN, Rana MS, Norden J, Airik R, Wakker V, De Gier-De Vries C, Brown NA, Kispert A, Moorman AFM, Christoffels VM. *The Tbx2+ primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle*. *Circulation Research*, 2009. 104(11): 1267-1274.
108. Ma Q, Zhou B, Pu WT. *Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity*. *Developmental Biology*, 2008. 323(1): 98-104.
109. Prall OWJ, Menon MK, Solloway MJ, Watanabe Y, Zaffran S, Bajolle F, Biben C, McBride JJ, Robertson BR, Chaulet H, Stennard FA, Wise N, Schaft D, Wolstein O, Furtado MB, Shiratori H, Chien KR, Hamada H, Black BL, Saga Y, Robertson EJ, Buckingham ME, Harvey RP. *An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 Negative Feedback Loop Controls Heart Progenitor Specification and Proliferation*. *Cell*, 2007. 128(5): 947-959.
110. Sun Y, Liang X, Najafi N, Cass M, Lin L, Cai CL, Chen J, Evans SM. *Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells*. *Developmental Biology*, 2007. 304(1): 286-296.
111. Engleka KA, Manderfield LJ, Brust RD, Li L, Cohen A, Dymecki SM, Epstein JA. *Islet1 derivatives in the heart are of both neural crest and second heart field origin*. *Circulation Research*, 2012. 110(7): 922-926.
112. Jensen B, Boukens BJD, Postma AV, Gunst QD, van den Hoff MJB, Moorman AFM, Wang T, Christoffels VM. *Identifying the Evolutionary Building Blocks of the Cardiac Conduction System*. *PLoS ONE*, 2012. 7(9).
113. Houweling AC, Somi S, Van Den Hoff MJB, Moorman AFM, Christoffels VM. *Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization*

- of cardiac chamber formation in chicken. Anatomical Record*, 2002. 266(2): 93-102.
114. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. *Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(52): 19812-19817.
  115. Cohen ED, Wang Z, Lepore JJ, Min ML, Taketo MM, Epstein DJ, Morrisey EE. *Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. Journal of Clinical Investigation*, 2007. 117(7): 1794-1804.
  116. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, Reinecke H, Moon RT, Murry CE. *Biphasic role for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(23): 9685-9690.
  117. Tian Y, Cohen ED, Morrisey EE. *The importance of Wnt signaling in cardiovascular development. Pediatric Cardiology*, 2010. 31(3): 342-348.
  118. Habas R, Dawid IB. *Dishevelled and Wnt signaling: Is the nucleus the final frontier? Journal of Biology*, 2005. 4(1).
  119. Eisenberg LM, Eisenberg CA. *Wnt signal transduction and the formation of the myocardium. Developmental Biology*, 2006. 293(2): 305-315.
  120. Klaus A, Saga Y, Taketo MM, Tzahor E, Birchmeier W. *Distinct roles of Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(47): 18531-18536.
  121. Terami H, Hidaka K, Katsumata T, Iio A, Morisaki T. *Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. 325(3): 968-975.

122. Koyanagi M, Haendeler J, Badorff C, Brandes RP, Hoffmann J, Pandur P, Zeiher AM, Kühl M, Dimmeler S. *Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells.* Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(17): 16838-16842.
123. Koyanagi M, Iwasaki M, Haendeler J, Leitges M, Zeiher AM, Dimmeler S. *Wnt5a increases cardiac gene expressions of cultured human circulating progenitor cells via a PKC delta activation.* PLoS ONE, 2009. 4(6).
124. Ilagan R, Abu-Issa R, Brown D, Yang YP, Jiao K, Schwartz RJ, Klingensmith J, Meyers EN. *Fgf8 is required for anterior heart field development.* Development, 2006. 133(12): 2435-2445.
125. Park EJ, Watanabe Y, Smyth G, Miyagawa-Tomita S, Meyers E, Klingensmith J, Camenisch T, Buckingham M, Moon AM. *An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart.* Development, 2008. 135(21): 3599-3610.
126. Hu T, Yamagishi H, Maeda J, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D. *Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors.* Development, 2004. 131(21): 5491-502.
127. Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A. *Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract.* Development, 2004. 131(13): 3217-27.
128. Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura KI, Meyers EN. *Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse.* Development, 2002. 129(19): 4613-4625.
129. Frank DU, Fotheringham LK, Brewer JA, Muglia LJ, Tristani-Firouzi M, Capecchi MR, Moon AM. *An Fgf8 mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome.* Development, 2002. 129(19): 4591-4603.
130. Vitelli F, Taddei I, Morishima M, Meyers EN, Lindsay EA, Baldini A. *A genetic link between Tbx1 and fibroblast growth factor signaling.* Development, 2002. 129(19): 4605-4611.

131. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S. *Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart*. *Developmental Cell*, 2003. 5(6): 877-889.
132. Zhang J, Lin Y, Zhang Y, Lan Y, Lin C, Moon AM, Schwartz RJ, Martin JF, Wang F. *Frs2 $\alpha$ -deficiency in cardiac progenitors disrupts a subset of FGF signals required for outflow tract morphogenesis*. *Development*, 2008. 135(21): 3611-3622.
133. Marguerie A, Bajolle F, Zaffran S, Brown NA, Dickson C, Buckingham ME, Kelly RG. *Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice*. *Cardiovascular Research*, 2006. 71(1): 50-60.
134. Li P, Pashmforoush M, Sucov HM. *Retinoic acid regulates differentiation of the secondary heart field and TGF $\beta$ -mediated outflow tract septation*. *Developmental cell*, 2010. 18(3): 480-485.
135. Liu W, Selever J, Wang D, Lu MF, Mosest KA, Schwartz RJ, Martin JF. *Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(13): 4489-4494.
136. Mesbah K, Rana MS, Francou A, van duivenboden K, Papaioannou VE, Moorman AF, Kelly RG, Christoffels VM. *Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial pole morphogenesis*. *Human Molecular Genetics*, 2012. 21(6): 1217-1229.
137. Rohatgi R, Scott MP. *Patching the gaps in Hedgehog signalling*. *Nature Cell Biology*, 2007. 9(9): 1005-1009.
138. Smoak IW, Byrd NA, Abu-Issa R, Goddeeris MM, Anderson R, Morris J, Yamamura K, Klingensmith J, Meyers EN. *Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development*. *Developmental Biology*, 2005. 283(2): 357-372.
139. Mumm JS, Kopan R. *Notch signaling: From the outside in*. *Developmental Biology*, 2000. 228(2): 151-165.



140. Swiatek PJ, Lindsell CE, Del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. *Notch1 is essential for postimplantation development in mice*. Genes and Development, 1994. 8(6): 707-719.
141. Kwon C, Qian L, Cheng P, Nigam V, Arnold J, Srivastava D. *A regulatory pathway involving Notch1/ $\beta$ -catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate*. Nature Cell Biology, 2009. 11(8): 951-957.
142. High FA, Jain R, Stoller JZ, Antonucci NB, Min ML, Loomes KM, Kaestner KH, Pear WS, Epstein JA. *Murine Jagged1/Notch signaling in the second heart field orchestrates Fgf8 expression and tissue-tissue interactions during outflow tract development*. Journal of Clinical Investigation, 2009. 119(7): 1986-1996.
143. Klaus A, Müller M, Schulz H, Saga Y, Martin JF, Birchmeier W. *Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. 109(27): 10921-10926.
144. Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P. *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development*. Nature Genetics, 1999. 21(4): 444-448.
145. Stainier DYR, Fishman MC. *Patterning the zebrafish heart tube: Acquisition of anteroposterior polarity*. Developmental Biology, 1992. 153(1): 91-101.
146. Yutzey KE, Rhee JT, Bader D. *Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart*. Development, 1994. 120(4): 871-883.
147. Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CYI, Cardoso WV, Rosenthal N, Xavier-Neto J. *A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field*. Development, 2003. 130(22): 5363-5374.
148. Sirbu IO, Zhao X, Duester G. *Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating Isl1 through the Fgf8 pathway*. Developmental Dynamics, 2008. 237(6): 1627-1635.

149. Ivins S, Van Beuren KL, Roberts C, James C, Lindsay E, Baldini A, Ataliotis P, Scambler PJ. *Microarray analysis detects differentially expressed genes in the pharyngeal region of mice lacking Tbx1*. *Developmental Biology*, 2005. 285(2): 554-569.
150. Guris DL, Duester G, Papaioannou VE, Imamoto A. *Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome*. *Developmental Cell*, 2006. 10(1): 81-92.
151. Roberts C, Ivins S, Cook AC, Baldini A, Scambler PJ. *Cyp26 genes a1, b1 and c1 are down-regulated in Tbx1 null mice and inhibition of Cyp26 enzyme function produces a phenocopy of DiGeorge Syndrome in the chick*. *Human Molecular Genetics*, 2006. 15(23): 3394-3410.
152. Ryckebusch L, Bertrand N, Mesbah K, Bajolle F, Niederreither K, Kelly RG, Zaffran S. *Decreased levels of embryonic retinoic acid synthesis accelerate recovery from arterial growth delay in a mouse model of digeorge syndrome*. *Circulation Research*, 2010. 106(4): 686-694.
153. Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, Papaioannou VE. *T-box genes in vertebrate development*. *Annual Review of Genetics*, 2005. 39: 219-239.
154. Hoogaars WMH, Barnett P, Moorman AFM, Christoffels VM. *Cardiovascular development: Towards biomedical applicability - T-box factors determine cardiac design*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007. 64(6): 646-660.
155. Greulich F, Rudat C, Kispert A. *Mechanisms of T-box gene function in the developing heart*. *Cardiovascular Research*, 2011. 91(2): 212-222.
156. Tada M, Smith JC. *T-targets: Clues to understanding the functions of T-box proteins*. *Development Growth and Differentiation*, 2001. 43(1): 1-11.
157. Boogerd CJJ, Moorman AFM, Barnett P. *Protein interactions at the heart of cardiac chamber formation*. *Annals of Anatomy*, 2009. 191(6): 505-517.
158. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. *A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-Box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease*. *Cell*, 2001. 106(6): 709-721.

159. Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, Shiratori H, Sakaki I, Ogura K, Saijoh Y, Ogura T. *Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis*. *Development*, 2003. 130(24): 5953-5964.
160. Hammer S, Toenjes M, Lange M, Fischer JJ, Dunkel I, Mebus S, Grimm CH, Hetzer R, Berger F, Sperling S. *Characterization of TBX20 in human hearts and its regulation by TFAP2*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008. 104(3): 1022-1033.
161. Liu C, Shen A, Li X, Jiao W, Zhang X, Li Z. *T-box transcription factor TBX20 mutations in Chinese patients with congenital heart disease*. *European Journal of Medical Genetics*, 2008. 51(6): 580-587.
162. Kirk EP, Sunde M, Costa MW, Rankin SA, Wolstein O, Castro ML, Butler TL, Hyun C, Guo G, Otway R, Mackay JP, Waddell LB, Cole AD, Hayward C, Keogh A, Macdonald P, Griffiths L, Fatkin D, Sholler GF, Zorn AM, Feneley MP, Winlaw DS, Harvey RP. *Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy*. *American Journal of Human Genetics*, 2007. 81(2): 280-291.
163. Shen T, Aneas I, Sakabe N, Dirschinger RJ, Wang G, Smemo S, Westlund JM, Cheng H, Dalton N, Gu Y, Boogerd CJ, Cai CL, Peterson K, Chen J, Nobrega MA, Evans SM. *Tbx20 regulates a genetic program essential to adult mouse cardiomyocyte function*. *Journal of Clinical Investigation*, 2011. 121(12): 4640-4654.
164. Cai CL, Zhou W, Yang L, Bu L, Qyang Y, Zhang X, Li X, Rosenfeld MG, Chen J, Evans S. *T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis*. *Development*, 2005. 132(10): 2475-2487.
165. Singh MK, Christoffels VM, Dias JM, Trowe MO, Petry M, Schuster-Gossler K, Bürger A, Ericson J, Kispert A. *Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2*. *Development*, 2005. 132(12): 2697-2707.

166. Stennard FA, Harvey RP. *T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart*. *Development*, 2005. 132(22): 4897-4910.
167. Takeuchi JK, Mileikowskaia M, Koshiba-Takeuchi K, Heidt AB, Mori AD, Arruda EP, Gertsenstein M, Georges R, Davidson L, Mo R, Hui CC, Henkelman RM, Nemer M, Black BL, Nagy A, Bruneau BG. *Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development*. *Development*, 2005. 132(10): 2463-2474.
168. Christoffels VM, Hoogaars WMH, Tessari A, Clout DEW, Moorman AFM, Campione M. *T-Box Transcription Factor Tbx2 Represses Differentiation and Formation of the Cardiac Chambers*. *Developmental Dynamics*, 2004. 229(4): 763-770.
169. Mesbah K, Harrelson Z, Théveniau-Ruissy M, Papaioannou VE, Kelly RG. *Tbx3 is required for outflow tract development*. *Circulation Research*, 2008. 103(7): 743-750.
170. Dupays L, Kotecha S, Angst B, Mohun TJ. *Tbx2 misexpression impairs deployment of second heart field derived progenitor cells to the arterial pole of the embryonic heart*. *Developmental Biology*, 2009. 333(1): 121-131.
171. Singh R, Horsthuis T, Farin HF, Grieskamp T, Norden J, Petry M, Wakker V, Moorman AFM, Christoffels VM, Kispert A. *Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal*. *Circulation Research*, 2009. 105(5): 442-452.
172. Singh R, Kispert A. *Tbx20, Smads, and the atrioventricular canal*. *Trends Cardiovasc Med*, 2010. 20(4): 109-14.
173. He ML, Wen L, Campbell CE, Wu JY, Rao Y. *Transcription repression by Xenopus ET and its human ortholog TBX3, a gene involved in ulnar-mammary syndrome*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. 96(18): 10212-10217.
174. Lingbeek ME, Jacobs JJL, Van Lohuizen M. *The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a*

- variant T-site in the initiator*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(29): 26120-26127.
175. Paxton C, Zhao H, Chin Y, Langner K, Reecy J. *Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription*. Gene, 2002. 283(1-2): 117-124.
  176. Hoogaars WMH, Tessari A, Moorman AFM, De Boer PAJ, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM. *The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart*. Cardiovascular Research, 2004. 62(3): 489-499.
  177. Hoogaars WMH, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, De Lange FJ, Wong LYE, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Ravestloot JH, Moorman AFM, Verheijck EE, Christoffels VM. *Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria*. Genes and Development, 2007. 21(9): 1098-1112.
  178. Bakker ML, Boukens BJ, Mommersteeg MTM, Brons JF, Wakker V, Moorman AFM, Christoffels VM. *Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system*. Circulation Research, 2008. 102(11): 1340-1349.
  179. Yelbuz TM, Waldo KL, Kumiski DH, Stadt HA, Wolfe RR, Leatherbury L, Kirby ML. *Shortened outflow tract leads to altered cardiac looping after neural crest ablation*. Circulation, 2002. 106(4): 504-510.
  180. Singh R, Hoogaars WM, Barnett P, Grieskamp T, Sameer Rana M, Buermans H, Farin HF, Petry M, Heallen T, Martin JF, Moorman AFM, Hoen PAC, Kispert A, Christoffels VM. *Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. 69(8): 1377-1389.
  181. Scambler PJ. *The 22q11 deletion syndromes*. Human Molecular Genetics, 2000. 9(16 REV. ISS.): 2421-2426.
  182. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A,

- Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. *Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome*. *Lancet*, 2003. 362(9393): 1366-73.
183. Brown CB, Wenning JM, Lu MM, Epstein DJ, Meyers EN, Epstein JA. *Cre-mediated excision of Fgf8 in the Tbx1 expression domain reveals a critical role for Fgf8 in cardiovascular development in the mouse*. *Developmental Biology*, 2004. 267(1): 190-202.
184. Huynh T, Chen L, Terrell P, Baldini A. *A fate map of Tbx1 expressing cells reveals heterogeneity in the second cardiac field*. *Genesis*, 2007. 45(7): 470-475.
185. Chen L, Fulcoli FG, Tang S, Baldini A. *Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors*. *Circulation Research*, 2009. 105(9): 842-851.
186. Théveniau-Ruissy M, Dandonneau M, Mesbah K, Ghez O, Mattei MG, Miquerol L, Kelly RG. *The del22q11.2 candidate gene tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning*. *Circulation Research*, 2008. 103(2): 142-148.
187. Vitelli F, Morishima M, Taddei I, Lindsay EA, Baldini A. *Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways*. *Human Molecular Genetics*, 2002. 11(8): 915-922.
188. Chen L, Fulcoli FG, Ferrentino R, Martucciello S, Illingworth EA, Baldini A. *Transcriptional control in cardiac progenitors: Tbx1 interacts with the BAF chromatin remodeling complex and regulates Wnt5a*. *PLoS Genetics*, 2012. 8(3).
189. Pane LS, Zhang Z, Ferrentino R, Huynh T, Cuttillo L, Baldini A. *Tbx1 is a negative modulator of Mef2c*. *Human Molecular Genetics*, 2012. 21(11): 2485-2496.
190. Yamagishi H, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, Meyers EN, Yamagishi C, Srivastava D. *Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer*. *Genes and Development*, 2003. 17(2): 269-281.

191. Zhang Z, Baldini A. *Manipulation of endogenous regulatory elements and transgenic analyses of the Tbx1 gene*. Mammalian Genome, 2010. 21(11-12): 556-564.
192. Okubo T, Kawamura A, Takahashi J, Yagi H, Morishima M, Matsuoka R, Takada S. *Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice*. Development, 2011. 138(2): 339-348.
193. Aggarwal VS, Liao J, Bondarev A, Schimmang T, Lewandoski M, Locker J, Shanske A, Campione M, Morrow BE. *Dissection of Tbx1 and Fgf interactions in mouse models of 22q11DS suggests functional redundancy*. Human Molecular Genetics, 2006. 15(21): 3219-3228.
194. Nowotschin S, Liao J, Gage PJ, Epstein JA, Campione M, Morrow BE. *Tbx1 affects asymmetric cardiac morphogenesis by regulating Pitx2 in the secondary heart field*. Development, 2006. 133(8): 1565-1573.
195. Calmont A, Ivins S, Van Bueren KL, Papangeli I, Kyriakopoulou V, Andrews WD, Martin JF, Moon AM, Illingworth EA, Basson MA, Scambler PJ. *Tbx1 controls cardiac neural crest cell migration during arch artery development by regulating Gbx2 expression in the pharyngeal ectoderm*. Development, 2009. 136(18): 3173-3183.
196. Randall V, McCue K, Roberts C, Kyriakopoulou V, Beddow S, Barrett AN, Vitelli F, Prescott K, Shaw-Smith C, Devriendt K, Bosman E, Steffes G, Steel KP, Simrick S, Basson MA, Illingworth E, Scambler PJ. *Great vessel development requires biallelic expression of Chd7 and Tbx1 in pharyngeal ectoderm in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2009. 119(11): 3301-3310.
197. Vitelli F, Lania G, Huynh T, Baldini A. *Partial rescue of the Tbx1 mutant heart phenotype by Fgf8: Genetic evidence of impaired tissue response to Fgf8*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010. 49(5): 836-840.
198. Guo C, Sun Y, Zhou B, Adam RM, Li X, Pu WT, Morrow BE, Moon A, Li X. *A Tbx1-Six1/Eya1-Fgf8 genetic pathway controls mammalian cardiovascular*

- and craniofacial morphogenesis*. Journal of Clinical Investigation, 2011. 121(4): 1585-1595.
199. Northcutt RG, Gans C. *The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins*. Quarterly Review of Biology, 1983. 58(1): 1-28.
  200. Theveneau E, Mayor R. *Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration*. Developmental Biology, 2012. 366(1): 34-54.
  201. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. *Fate of the mammalian cardiac neural crest*. Development, 2000. 127(8): 1607-1616.
  202. De Lange FJ, Moorman AFM, Anderson RH, Männer J, Soufan AT, De Gier-De Vries C, Schneider MD, Webb S, Van Den Hoff MJB, Christoffels VM. *Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves*. Circulation Research, 2004. 95(6): 645-654.
  203. Singh N, Trivedi CM, Lu M, Mullican SE, Lazar MA, Epstein JA. *Histone deacetylase 3 regulates smooth muscle differentiation in neural crest cells and development of the cardiac outflow tract*. Circulation Research, 2011. 109(11): 1240-1249.
  204. Hutson MR, Zeng XL, Kim AJ, Antoon E, Harward S, Kirby ML. *Arterial pole progenitors interpret opposing FGF/BMP signals to proliferate or differentiate*. Development, 2010. 137(18): 3001-3011.
  205. Kirby ML, Turnage lii KL, Hays BM. *Characterization of conotruncal malformations following ablation of 'cardiac' neural crest*. Anatomical Record, 1985. 213(1): 87-93.
  206. Besson lii WT, Kirby ML, Van Mierop LHS, Teabeaut li JR. *Effects of the size of lesions of the cardiac neural crest at various embryonic ages on incidence and type of cardiac defects*. Circulation, 1986. 73(2): 360-364.
  207. Nishibatake M, Kirby ML, Van Mierop LHS. *Pathogenesis of persistent truncus arteriosus and dextroposed aorta in the chick embryo after neural crest ablation*. Circulation, 1987. 75(1): 255-264.



208. Hutson MR, Zhang P, Stadt HA, Sato AK, Li YX, Burch J, Creazzo TL, Kirby ML. *Cardiac arterial pole alignment is sensitive to FGF8 signaling in the pharynx*. *Developmental Biology*, 2006. 295(2): 486-497.
209. Tikkanen J, Heinonen OP. *Risk factors for cardiovascular malformations in Finland*. *Eur J Epidemiol*, 1990. 6(4): 348-56.
210. Ferencz C, Rubin JD, Loffredo CA, Magee CA. *Epidemiology of Congenital Heart Disease: The Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989*, 1993.
211. Kidd SA, Lancaster PAL, McCredie RM. *The incidence of congenital heart defects in the first year of life*. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 1993. 29(5): 344-349.
212. Hollier LM, Leveno KJ, Kelly MA, McIntire DD, Cunningham FG. *Maternal age and malformations in singleton births*. *Obstetrics and Gynecology*, 2000. 96(5): 701-706.
213. Materna-Kirylyuk A, Wiśniewska K, Badura-Stronka M, Mejnartowicz J, Więckowska B, Balcar-Boroń A, Czerwionka-Szaflarska M, Gajewska E, Godula-Stuglik U, Krawczyński M, Limon J, Rusin J, Sawulicka-Oleszczuk H, Szwalkiewicz-Warowicka E, Walczak M, Latos-Bieleńska A. *Parental age as a risk factor for isolated congenital malformations in a Polish population*. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 2009. 23(1): 29-40.
214. Miller A, Riehle-Colarusso T, Siffel C, Frías JL, Correa A. *Maternal age and prevalence of isolated congenital heart defects in an urban area of the United States*. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 2011. 155(9): 2137-2145.
215. Gill SK, Broussard C, Devine O, Green RF, Rasmussen SA, Reefhuis J. *Association between maternal age and birth defects of unknown etiology - United States, 1997-2007*. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2012. 94(12): 1010-1018.
216. Janssen PA, Rothman I, Schwartz SM. *Congenital malformations in newborns of women with established and gestational diabetes in Washington State, 1984-91*. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 1996. 10(1): 52-63.

217. Loffredo CA, Wilson PD, Ferencz C. *Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants*. *Teratology*, 2001. 64(2): 98-106.
218. Correa A, Gilboa SM, Besser LM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, Cleves MA, Riehle-Colarusso TJ, Waller DK, Reece EA. *Diabetes mellitus and birth defects*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2008. 199(3): 237.e1-237.e9.
219. Garne E, Loane M, Dolk H, Barisic I, Addor MC, Arriola L, Bakker M, Calzolari E, Matias Dias C, Doray B, Gatt M, Melve KK, Nelen V, O'Mahony M, Pierini A, Randrianaivo-Ranjatoelina H, Rankin J, Rissmann A, Tucker D, Verellun-Dumoulin C, Wiesel A. *Spectrum of congenital anomalies in pregnancies with pregestational diabetes*. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2012. 94(3): 134-140.
220. Kousseff BG. *Diabetic embryopathy*. *Current Opinion in Pediatrics*, 1999. 11(4): 348-352.
221. Tararbit K, Houyel L, Bonnet D, De Vigan C, Lelong N, Goffinet F, Khoshnood B. *Risk of congenital heart defects associated with assisted reproductive technologies: A population-based evaluation*. *European Heart Journal*, 2011. 32(4): 500-508.
222. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, Correa A, Hobbs CA, Rasmussen SA. *Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States*. *Human Reproduction*, 2009. 24(2): 360-366.
223. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, Rasmussen SA. *Use of clomiphene citrate and birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2005*. *Human Reproduction*, 2011. 26(2): 451-457.
224. Duong HT, Hoyt AT, Carmichael SL, Gilboa SM, Canfield MA, Case A, McNeese ML, Waller DK. *Is maternal parity an independent risk factor for birth defects?* *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2012. 94(4): 230-236.
225. Pradat P, Francannet C, Harris JA, Robert E. *The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large*

- registries of congenital malformations*. *Pediatr Cardiol*, 2003. 24(3): 195-221.
226. Barquera S, Campos I, Rivera JA. *Mexico attempts to tackle obesity: the process, results, push backs and future challenges*. *Obes Rev*, 2013. 14 Suppl 2: 69-78.
227. Cedergren MI, Källén BAJ. *Maternal obesity and infant heart defects*. *Obesity Research*, 2003. 11(9): 1065-1071.
228. Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. *Maternal obesity and risk for birth defects*. *Pediatrics*, 2003. 111(5 II): 1152-1158.
229. Blomberg MI, Källén B. *Maternal obesity and morbid obesity: The risk for birth defects in the offspring*. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2010. 88(1): 35-40.
230. Mills JL, Troendle J, Conley MR, Carter T, Druschel CM. *Maternal obesity and congenital heart defects: A population-based study*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2010. 91(6): 1543-1549.
231. Madsen NL, Schwartz SM, Lewin MB, Mueller BA. *Prepregnancy Body Mass Index and Congenital Heart Defects among Offspring: A Population-based Study*. *Congenital Heart Disease*, 2013. 8(2): 131-141.
232. Carmichael SL, Shaw GM, Yang W, Abrams B, Lammer EJ. *Maternal stressful life events and risks of birth defects*. *Epidemiology*, 2007. 18(3): 356-361.
233. Rowland JM, Hendrickx AG. *Corticosteroid teratogenicity*. *Advances in veterinary science and comparative medicine*, 1983. 27: 99-128.
234. Liu S, Liu J, Tang J, Ji J, Chen J, Liu C. *Environmental risk factors for congenital heart disease in the Shandong peninsula, China: A hospital-based case-control study*. *Journal of Epidemiology*, 2009. 19(3): 122-130.
235. Ferencz C, Loffredo CA, Correa-Villasenor A, Wilson PD. *Genetic and Environmental Risk Factors of Major Cardiovascular Malformations: The Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989*, 1997.
236. Bakker MK, Kerstjens-Frederikse WS, Buys CHCM, De Walle HEK, De Jong-van Den Berg LTW. *First-trimester use of paroxetine and congenital*

- heart defects: A population-based case-control study.* Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology, 2010. 88(2): 94-100.
237. Malm H, Artama M, Gissler M, Ritvanen A. *Selective serotonin reuptake inhibitors and risk for major congenital anomalies.* Obstetrics and Gynecology, 2011. 118(1): 111-120.
238. Polen KND, Rasmussen SA, Riehle-Colarusso T, Reefhuis J. *Association between reported venlafaxine use in early pregnancy and birth defects, national birth defects prevention study, 1997-2007.* Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology, 2013. 97(1): 28-35.
239. Caton AR, Bell EM, Druschel CM, Werler MM, Lin AE, Browne ML, McNutt LA, Romitti PA, Mitchell AA, Olney RS, Correa A. *Antihypertensive medication use during pregnancy and the risk of cardiovascular malformations.* Hypertension, 2009. 54(1): 63-70.
240. Lennestål R, Otterblad Olausson P, Källén B. *Maternal use of antihypertensive drugs in early pregnancy and delivery outcome, notably the presence of congenital heart defects in the infants.* European journal of clinical pharmacology, 2009. 65(6): 615-625.
241. Li DK, Yang C, Andrade S, Tavares V, Ferber JR. *Maternal exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors in the first trimester and risk of malformations in offspring: A retrospective cohort study.* BMJ (Online), 2011. 343(7829).
242. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. *Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects.* New England Journal of Medicine, 2000. 343(22): 1608-1614.
243. Czeizel AE, Rockenbauer M, Sørensen HT, Olsen J. *The teratogenic risk of trimethoprim-sulfonamides: A population based case-control study.* Reproductive Toxicology, 2001. 15(6): 637-646.
244. Matok I, Gorodischer R, Koren G, Landau D, Wiznitzer A, Levy A. *Exposure to folic acid antagonists during the first trimester of pregnancy and the risk of major malformations.* British Journal of Clinical Pharmacology, 2009. 68(6): 956-962.

245. Czeizel AE, Rockenbauer M, Mosonyi A. *A population-based case-control teratologic study of acetylsalicylic acid treatments during pregnancy.* *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 2000. 9(3): 193-205.
246. Källén BAJ, Otterblad Olausson P. *Maternal drug use in early pregnancy and infant cardiovascular defect.* *Reproductive Toxicology*, 2003. 17(3): 255-261.
247. van Gelder MMHJ, Roeleveld N, Nordeng H. *Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the risk of selected birth defects: A prospective cohort study.* *PLoS ONE*, 2011. 6(7).
248. Hernandez RK, Werler MM, Romitti P, Sun L, Anderka M. *Nonsteroidal antiinflammatory drug use among women and the risk of birth defects.* *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2012. 206(3): 228.e1-228.e8.
249. Källén B, Olausson PO. *Use of anti-asthmatic drugs during pregnancy. 3. Congenital malformations in the infants.* *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2007. 63(4): 383-388.
250. Lin S, Herdt-Losavio M, Gensburg L, Marshall E, Druschel C. *Maternal asthma, asthma medication use, and the risk of congenital heart defects.* *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2009. 85(2): 161-168.
251. Czeizel AE. *Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation.* *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 1998. 78(2): 151-161.
252. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. *Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use.* *American Journal of Epidemiology*, 2000. 151(9): 878-884.
253. Van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, Den Heijer M, Blom HJ, De Walle HEK. *Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defects: A registry-based case-control study in the northern Netherlands.* *European Heart Journal*, 2010. 31(4): 464-471.

254. Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD. *Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: Results from a population-based, case-control study*. Pediatrics, 1996. 98(5): 911-917.
255. Csáky-Szunyogh M, Vereczkey A, Kósa Z, Urbán R, Czeizel AE. *Association of maternal diseases during pregnancy with the risk of single ventricular septal defects in the offspring - A population-based case-control study*. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 2013. 26(8): 738-747.
256. Czeizel AE, Dobó M, Vargha P. *Hungarian cohort-controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation shows a reduction in certain congenital abnormalities*. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology, 2004. 70(11): 853-861.
257. Smedts HPM, Rakhshandehroo M, Verkleij-Hagoort AC, De Vries JHM, Ottenkamp J, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM. *Maternal intake of fat, riboflavin and nicotinamide and the risk of having offspring with congenital heart defects*. European Journal of Nutrition, 2008. 47(7): 357-365.
258. Correa A, Gilboa SM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, Cleves MA, Riehle-Colarusso TJ, Waller DK, Reece EA. *Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus associated birth defects*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2012. 206(3): 218.e1-218.e13.
259. Baird CD, Nelson MM, Monie IW, Evans HM. *Congenital cardiovascular anomalies induced by pteroylglutamic acid deficiency during gestation in the rat*. Circ Res, 1954. 2(6): 544-54.
260. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. *Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(26): 15227-32.
261. Tikkanen J, Heinonen OP. *Maternal exposure to chemical and physical factors during pregnancy and cardiovascular malformations in the offspring*. Teratology, 1991. 43(6): 591-600.

262. Carmichael SL, Shaw GM, Yang W, Lammer EJ. *Maternal Periconceptional Alcohol Consumption and Risk for Conotruncal Heart Defects*. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology, 2003. 67(10): 875-878.
263. Mateja WA, Nelson DB, Kroelinger CD, Ruzek S, Segal J. *The association between maternal alcohol use and smoking in early pregnancy and congenital cardiac defects*. Journal of Women's Health, 2012. 21(1): 26-34.
264. Malik S, Cleves MA, Honein MA, Romitti PA, Botto LD, Yang S, Hobbs CA. *Maternal smoking and congenital heart defects*. Pediatrics, 2008. 121(4): e810-e816.
265. Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. *Maternal smoking in pregnancy and birth defects: A systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls*. Human Reproduction Update, 2011. 17(5): 589-604.
266. Karatza AA, Giannakopoulos I, Dassios TG, Belavgenis G, Mantagos SP, Varvarigou AA. *Periconceptional tobacco smoking and isolated congenital heart defects in the neonatal period*. International Journal of Cardiology, 2011. 148(3): 295-299.
267. Lee LJ, Lupo PJ. *Maternal smoking during pregnancy and the risk of congenital heart defects in offspring: A systematic review and metaanalysis*. Pediatric Cardiology, 2013. 34(2): 398-407.
268. Lipshultz SE, Frassica JJ, Orav EJ. *Cardiovascular abnormalities in infants prenatally exposed to cocaine*. Journal of Pediatrics, 1991. 118(1): 44-51.
269. Xiao Y, Xiao D, He J, Zhang L. *Maternal cocaine administration during pregnancy induces apoptosis in fetal rat heart*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2001. 37(6): 639-648.
270. Williams LJ, Correa A, Rasmussen S. *Maternal Lifestyle Factors and Risk for Ventricular Septal Defects*. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology, 2004. 70(2): 59-64.
271. Dolk H, Armstrong B, Lachowycz K, Vrijheid M, Rankin J, Abramsky L, Boyd PA, Wellesley D. *Ambient air pollution and risk of congenital anomalies in England, 1991-1999*. Occupational and Environmental Medicine, 2010. 67(4): 223-227.

272. Ritz B, Yu F, Fruin S, Chapa G, Shaw GM, Harris JA. *Ambient air pollution and risk of birth defects in southern california*. American Journal of Epidemiology, 2002. 155(1): 17-25.
273. Gilboa SM, Mendola P, Olshan AF, Langlois PH, Savitz DA, Loomis D, Herring AH, Fixler DE. *Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997-2000*. American Journal of Epidemiology, 2005. 162(3): 238-252.
274. Hansen CA, Barnett AG, Jalaludin BB, Morgan GG. *Ambient air pollution and birth defects in Brisbane*. Australia. PLoS One, 2009. 4: 5408.
275. Strickland MJ, Klein M, Correa A, Reller MD, Mahle WT, Riehle-Colarusso TJ, Botto LD, Flanders WD, Mulholland JA, Siffel C, Marcus M, Tolbert PE. *Ambient air pollution and cardiovascular malformations in Atlanta, Georgia, 1986-2003*. American Journal of Epidemiology, 2009. 169(8): 1004-1014.
276. Dadvand P, Rankin J, Rushton S, Pless-Mulloli T. *Ambient air pollution and congenital heart disease: A register-based study*. Environmental Research, 2011. 111(3): 435-441.
277. Anway MD, Skinner MK. *Epigenetic programming of the germ line: Effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease*. Reproductive BioMedicine Online, 2008. 16(1): 23-25.
278. Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KMK. *Epigenetic control of fetal gene expression*. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2008. 115(2): 158-168.
279. Shaw GM, Schulman J, Frisch JD, Cummins SK, Harris JA. *Congenital malformations and birthweight in areas with potential environmental contamination*. Archives of Environmental Health, 1992. 47(2): 147-154.
280. Snijder CA, Vlot IJ, Burdorf A, Obermann-Borst SA, Helbing WA, Wildhagen MF, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM. *Congenital heart defects and parental occupational exposure to chemicals*. Human Reproduction, 2012. 27(5): 1510-1517.
281. Yauck JS, Malloy ME, Blair K, Simpson PM, McCarver DG. *Proximity of residence to trichloroethylene-emitting sites and increased risk of offspring*



- congenital heart defects among older women. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2004. 70(10): 808-814.
282. Hardin BD, Kelman BJ, Brent RL. *Trichloroethylene and dichloroethylene: A critical review of teratogenicity. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 2005. 73(12): 931-955.
283. Watson RE, Jacobson CF, Williams AL, Howard WB, Desesso JM. *Trichloroethylene-contaminated drinking water and congenital heart defects: A critical analysis of the literature. Reprod Toxicol*, 2006. 21: 117-147.
284. Pitt DB. *A family study of Fallot's tetrad. Australas Ann Med*, 1962. 11: 179-83.
285. Boon AR, Farmer MB, Roberts DF. *A family study of Fallot's tetralogy. J Med Genet*, 1972. 9(2): 179-92.
286. Der Kaloustian VM, Ratl H, Malouf J, Hatem J, Slim M, Tomeh A, Khouri J, Kutayli F. *Tetralogy of Fallot with pulmonary atresia in siblings. Am J Med Genet*, 1985. 21(1): 119-22.
287. Lynch HT, Tips RL, Krush AJ. *Tetralogy of fallot in two siblings: Associated anomalies of the head and neck in one child. American Journal of Diseases of Children*, 1966. 111(3): 304-307.
288. Friedberg DZ. *Tetralogy of Fallot with right aortic arch in three successive generations. Am J Dis Child*, 1974. 127(6): 877-8.
289. Jones MC, Waldman JD. *An autosomal dominant syndrome of characteristic facial appearance, preauricular pits, fifth finger clinodactyly, and tetralogy of Fallot. Am J Med Genet*, 1985. 22(1): 135-41.
290. Pankau R, Siekmeyer W, Stoffregen R. *Tetralogy of Fallot in three sibs. Am J Med Genet*, 1990. 37(4): 532-3.
291. Pacileo G, Musewe NN, Calabro R. *Tetralogy of Fallot in three siblings: a familial study and review of the literature. Eur J Pediatr*, 1992. 151(10): 726-7.
292. Digilio MC, Marino B, Giannotti A, Toscano A, Dallapiccola B. *Recurrence risk figures for isolated tetralogy of Fallot after screening for 22q11 microdeletion. J Med Genet*, 1997. 34(3): 188-90.

293. De Luca A, Sarkozy A, Ferese R, Consoli F, Lepri F, Dentici M, Vergara P, De Zorzi A, Versacci P, Digilio M, Marino B, Dallapiccola B. *New mutations in ZFPM2/FOG2 gene in tetralogy of Fallot and double outlet right ventricle*. *Clinical Genetics*, 2011. 80(2): 184-190.
294. Karkera JD, Lee JS, Roessler E, Banerjee-Basu S, Ouspenskaia MV, Mez J, Goldmuntz E, Bowers P, Towbin J, Belmont JW, Baxevanis AD, Schier AF, Muenke M. *Loss-of-function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans*. *American Journal of Human Genetics*, 2007. 81(5): 987-994.
295. Tomita-Mitchell A, Maslen CL, Morris CD, Garg V, Goldmuntz E. *GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease*. *Journal of Medical Genetics*, 2007. 44(12): 779-783.
296. Lin X, Huo Z, Liu X, Zhang Y, Li L, Zhao H, Yan B, Liu Y, Yang Y, Chen YH. *A novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect*. *Journal of Human Genetics*, 2010. 55(10): 662-667.
297. Roessler E, Pei W, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Veléz JI, Banerjee-Basu S, Gibney G, Lupo PJ, Mitchell LE, Towbin JA, Bowers P, Belmont JW, Goldmuntz E, Baxevanis AD, Feldman B, Muenke M. *Cumulative ligand activity of NODAL mutations and modifiers are linked to human heart defects and holoprosencephaly*. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2009. 98(1-2): 225-234.
298. Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW. *NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot*. *Circulation*, 2001. 104(21): 2565-2568.
299. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, Koch A, Zink S, Trautmann U, Hoyer J, Kaulitz R, Singer H, Rauch A. *Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot*. *Journal of Medical Genetics*, 2010. 47(5): 321-331.
300. Clark KL, Yutzey KE, Benson DW. *Transcription factors and congenital heart defects*. *Annu Rev Physiol*, 2006. 68: 97-121.
301. Bentham J, Bhattacharya S. *Genetic mechanisms controlling cardiovascular development*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1123: 10-9.

302. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. *Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5*. *Science*, 1998. 281(5373): 108-11.
303. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. *Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways*. *Journal of Clinical Investigation*, 1999. 104(11): 1567-1573.
304. Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW. *NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot*. *Circulation*, 2001. 104(21): 2565-8.
305. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. *Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation*. *Nature Genetics*, 2001. 28(3): 276-280.
306. Granados-Riveron JT, Pope M, Bu'Lock FA, Thornborough C, Eason J, Setchfield K, Ketley A, Kirk EP, Fatkin D, Feneley MP, Harvey RP, Brook JD. *Combined mutation screening of NKX2-5, GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: Multiple heterozygosity and novel mutations*. *Congenital Heart Disease*, 2012. 7(2): 151-159.
307. Liu XY, Wang J, Yang YQ, Zhang YY, Chen XZ, Zhang W, Wang XZ, Zheng JH, Chen YH. *Novel NKX2-5 mutations in patients with familial atrial septal defects*. *Pediatr Cardiol*, 2011. 32(2): 193-201.
308. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. *NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 42(9): 1650-5.
309. Kwon SM, Alev C, Asahara T. *The Role of Notch Signaling in Endothelial Progenitor Cell Biology*. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2009. 19(5): 170-173.
310. MacGrogan D, Nus M, Pompa JLDL, *Notch signaling in cardiac development and disease*. 2010. p. 333-365.

311. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont MEM, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB. *Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for notch1*. Nature Genetics, 1997. 16(3): 243-251.
312. Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC. *Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome*. Nat Genet, 1997. 16(3): 235-42.
313. McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. *NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway*. American Journal of Human Genetics, 2006. 79(1): 169-173.
314. Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC. *Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome*. Nature Genetics, 1997. 16(3): 235-242.
315. Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, Krantz ID, Spinner NB, Piccoli DA. *Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis*. Hepatology, 1999. 29(3): 822-9.
316. Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC. *Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene*. Human Molecular Genetics, 2001. 10(2): 163-169.
317. Bauer RC, Laney AO, Smith R, Gerfen J, Morrissette JJD, Woyciechowski S, Garbarini J, Loomes KM, Krantz ID, Urban Z, Gelb BD, Goldmuntz E, Spinner NB. *Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of fallot or pulmonic stenosis*. Human Mutation, 2010. 31(5): 594-601.
318. Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC. *Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene*. Hum Mol Genet, 2001. 10(2): 163-9.
319. Pizzuti A, Sarkozy A, Newton AL, Conti E, Flex E, Digilio MC, Amati F, Gianni D, Tandoi C, Marino B, Crossley M, Dallapiccola B. *Mutations of*

- ZFPM2/FOG2 Gene in Sporadic Cases of Tetralogy of Fallot.* Human Mutation, 2003. 22(5): 372-377.
320. Holmes M, Turner J, Fox A, Chisholm O, Crossley M, Chong B. *hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation.* J Biol Chem, 1999. 274(33): 23491-8.
321. Sarkozy A, Esposito G, Conti E, Digilio MC, Marino B, Calabrò R, Pizzuti A, Dallapiccola B. *CRELD1 and GATA4 gene analysis in patients with nonsyndromic atrioventricular canal defects [3].* American Journal of Medical Genetics, 2005. 139 A(3): 236-238.
322. Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, Shen J, Manichaikul A, Tomita-Mitchell A, Boardman K, Briggs C, Garg V, Srivastava D, Goldmuntz E, Broman KW, Woodrow Benson D, Smoot LB, Pu WT. *Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2007. 43(6): 677-685.
323. Tomita-Mitchell A, Maslen CL, Morris CD, Garg V, Goldmuntz E. *GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease.* J Med Genet, 2007. 44(12): 779-83.
324. Zhang W, Li X, Shen A, Jiao W, Guan X, Li Z. *GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease.* Eur J Med Genet, 2008. 51(6): 527-35.
325. Lin X, Huo Z, Liu X, Zhang Y, Li L, Zhao H, Yan B, Liu Y, Yang Y, Chen YH. *A novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect.* J Hum Genet, 2010. 55(10): 662-7.
326. Maitra M, Koenig SN, Srivastava D, Garg V. *Identification of GATA6 sequence variants in patients with congenital heart defects.* Pediatr Res, 2010. 68(4): 281-5.
327. Peng T, Wang L, Zhou SF, Li X. *Mutations of the GATA4 and NKX2.5 genes in Chinese pediatric patients with non-familial congenital heart disease.* Genetica, 2010. 138(11-12): 1231-40.
328. Wat MJ, Shchelochkov OA, Holder AM, Breman AM, Dagli A, Bacino C, Scaglia F, Zori RT, Cheung SW, Scott DA, Kang SH. *Chromosome 8p23.1*

- deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia. Am J Med Genet A, 2009. 149A(8): 1661-77.*
329. Barber JC, Maloney VK, Huang S, Bunyan DJ, Cresswell L, Kinning E, Benson A, Cheetham T, Wyllie J, Lynch SA, Zvolinski S, Prescott L, Crow Y, Morgan R, Hobson E. *8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. Eur J Hum Genet, 2008. 16(1): 18-27.*
330. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Yamamura E, Joo K, Takahashi T, Matsuoka R, Yamagishi H. *GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. 106(33): 13933-13938.*
331. Rankin CT, Bunton T, Lawler AM, Lee SJ. *Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. Nat Genet, 2000. 24(3): 262-5.*
332. Roessler E, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Vélez JI, Kantipong A, Lacbawan F, Bowers P, Belmont JW, Towbin JA, Goldmuntz E, Feldman B, Muenke M. *Reduced NODAL Signaling Strength via Mutation of Several Pathway Members Including FOXH1 Is Linked to Human Heart Defects and Holoprosencephaly. American Journal of Human Genetics, 2008. 83(1): 18-29.*
333. Shen MM. *Nodal signaling: developmental roles and regulation. Development, 2007. 134(6): 1023-34.*
334. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. *Copy number variation: new insights in genome diversity. Genome Res, 2006. 16(8): 949-61.*
335. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F,

- Zhang J, Zerjal T, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. *Global variation in copy number in the human genome*. Nature, 2006. 444(7118): 444-54.
336. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. *Structural variation in the human genome*. Nature Reviews Genetics, 2006. 7(2): 85-97.
337. Alkan C, Coe BP, Eichler EE. *Genome structural variation discovery and genotyping*. Nat Rev Genet, 2011. 12(5): 363-76.
338. Lupski JR, Stankiewicz P. *Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes*. PLoS Genet, 2005. 1(6): e49.
339. Wain LV, Armour JA, Tobin MD. *Genomic copy number variation, human health, and disease*. Lancet, 2009. 374(9686): 340-50.
340. Lee C, Scherer SW. *The clinical context of copy number variation in the human genome*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2010. 12.
341. Stankiewicz P, Lupski JR. *Structural variation in the human genome and its role in disease*. Annu Rev Med, 2010. 61: 437-55.
342. Prescott K, Ivins S, Hubank M, Lindsay E, Baldini A, Scambler P. *Microarray analysis of the Df1 mouse model of the 22q11 deletion syndrome*. Human Genetics, 2005. 116(6): 486-496.
343. Krepischi-Santos ACV, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki C, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. *Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: Old syndromes revisited and new alterations*. Cytogenetic and Genome Research, 2006. 115(3-4): 254-261.
344. Thienpont B, Breckpot J, Holvoet M, Vermeesch RJ, Devriendt K. *A microduplication of CBP in a patient with mental retardation and a congenital heart defect*. American Journal of Medical Genetics, Part A, 2007. 143(18): 2160-2164.
345. Erdogan F, Belloso JM, Gabau E, Ajbro KD, Guitart M, Ropers HH, Tommerup N, Ullmann R, Tümer Z, Larsen LA. *Fine mapping of a de novo*

- interstitial 10q22-q23 duplication in a patient with congenital heart disease and microcephaly*. European Journal of Medical Genetics, 2008. 51(1): 81-86.
346. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, Zinn AR, Garg V. *Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease*. Pediatric Research, 2008. 64(4): 358-363.
347. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, Depalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, Ergul E, Conta JH, Korn JM, McCarroll SA, Gorham JM, Gabriel S, Altshuler DM, De Lourdes Quintanilla-Dieck M, Artunduaga MA, Eavey RD, Plenge RM, Shadick NA, Weinblatt ME, De Jager PL, Hafler DA, Breitbart RE, Seidman JG, Seidman CE. *De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot*. Nature Genetics, 2009. 41(8): 931-935.
348. Wang J, Xie X, Zhou S, Huang G, Ma X, Suo P, Zhou S, Wang B, Ma X. *The study of copy number variations in the regions of NOTCH1 among Chinese VSD and TOF patients*. International Journal of Cardiology, 2011. 147(3): 444-446.
349. Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Struble CA, Tuffnell ME, Stamm KD, Hidestrand M, Harris SE, Goetsch MA, Simpson PM, Bick DP, Broeckel U, Pelech AN, Tweddell JS, Mitchell ME. *Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations*. Physiol Genomics, 2012. 44(9): 518-41.
350. Bansal V, Dorn C, Grunert M, Klaassen S, Hetzer R, Berger F, Sperling SR. *Outlier-based identification of copy number variations using targeted resequencing in a small cohort of patients with Tetralogy of Fallot*. PLoS One, 2014. 9(1): e85375.
351. Bittel DC, Zhou XG, Kibiryeveva N, Fiedler S, O'Brien JE, Jr., Marshall J, Yu S, Liu HY. *Ultra high-resolution gene centric genomic structural analysis of a non-syndromic congenital heart defect, Tetralogy of Fallot*. PLoS One, 2014. 9(1): e87472.



352. Silversides CK, Lionel AC, Costain G, Merico D, Migita O, Liu B, Yuen T, Rickaby J, Thiruvahindrapuram B, Marshall CR, Scherer SW, Bassett AS. *Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways*. PLoS Genet, 2012. 8(8): e1002843.
353. Calderón-Colmenero J. *Métodos diagnósticos en las cardiopatías congénitas*. Archivos de cardiología de México, 2006. 76: 152-156.
354. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultchi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. *TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome*. Cell, 2001. 104(4): 619-629.
355. Hu T, Yamagishi H, Maeda J, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D. *Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors*. Development, 2004. 131(21): 5491-5502.
356. Funato N, Nakamura M, Richardson JA, Srivastava D, Yanagisawa H. *Tbx1 regulates oral epithelial adhesion and palatal development*. Human Molecular Genetics, 2012. 21(11): 2524-2537.
357. Griffin HR, Topf A, Glen E, Zweier C, Stuart AG, Parsons J, Peart I, Deanfield J, O'Sullivan J, Rauch A, Scambler P, Burn J, Cordell HJ, Keavney B, Goodship JA. *Systematic survey of variants in TBX1 in non-syndromic tetralogy of Fallot identifies a novel 57 base pair deletion that reduces transcriptional activity but finds no evidence for association with common variants*. Heart, 2010. 96(20): 1651-5.
358. Macdonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. *The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome*. Nucleic Acids Res, 2014. 42(1): D986-92.
359. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson

- S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME. *Origins and functional impact of copy number variation in the human genome*. Nature, 2010. 464(7289): 704-12.
360. Cabuk F, Karabulut HG, Tuncali T, Karademir S, Bozdayi M, Tukun A. *TBX1 gene mutation screening in patients with non-syndromic Fallot tetralogy*. Turk J Pediatr, 2007. 49(1): 61-8.
361. Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A. *Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract*. Development, 2004. 131(13): 3217-3227.
362. Scambler PJ. *22q11 Deletion syndrome: A role for TBX1 in pharyngeal and cardiovascular development*. Pediatric Cardiology, 2010. 31(3): 378-390.
363. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. *Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis*. Hum Mol Genet, 2000. 9(4): 489-501.