



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS

*Frecuencia de microdeleciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía
congénita conotruncal aislada del HP del CMN SXXI, IMSS*

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN
Para obtener el diploma de

Especialista en Genética Médica que
P R E S E N T A
Lilia Guadalupe Ochoa Lugo

Directores de la tesis:

Dr. Fabio Salamanca Gómez

M. en C. Ana Claudia Velázquez Wong

M. en C. Eunice López Muñoz

Colaboradora: Dra. Luisa Gracia Beirana Palencia



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María de Jesús y Daniel, por su apoyo, su amor, su ejemplo.

Gracias mamá por estar siempre ahí con tu ternura y cuidados, para impulsarme a salir adelante, por que nunca me dejaste caer.

Gracias papá por estar presente aún en la distancia, con tus consejos y palabras de aliento.

A mi novio y prometido Israel, por su amor incondicional, tolerancia, entrega, apoyo, comprensión y su gran ayuda en todo lo que he necesitado.

A mi hermano Daniel, por animarme día a día y hacerme creer en todo momento que yo podía con cada prueba que se presentara, por difícil que esta fuera.

Al resto de mi familia, tíos y primos, en especial a mi tía Imelda, mi prima Velia y mi tía Alba, por su cariño, apoyo y confianza.

A mis maestros, por compartir sus conocimientos y enseñarme no sólo cuestiones académicas, sino a ser una mejor persona, más sensible, para atender a nuestros pacientes con calidad.

A todos los pacientes, pues son la razón de mi formación profesional, y por que siempre serán una motivación para ser cada día mejor genetista.

A todo el personal del Hospital de Pediatría, por que gracias a su atención amable las cosas siempre fueron más fáciles.

Dr. Fabio Salamanca Gómez

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana

Dr. Miguel Ángel Villasís Keever

Director de Educación e Investigación Médica

Dra. María Antonieta de Jesús Araujo Solís

Jefe del Servicio de Genética Clínica

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Doctor en Ciencias Unidad de Investigación Médica en Genética Humana

Dra. Luisa Gracia Beirana Palencia

Médico de base de Cardiología Pediátrica

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

Resumen.....	5
Marco Teórico.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Aspectos Clínicos De Las Malformaciones Conotroncales	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Embriología Del Aparato Cardiovascular.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Anomalías Del Corazón Y Los Grandes Vasos:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Genes Implicados En El Desarrollo Cardíaco Temprano	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Epidemiología:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<i>Diagnóstico Etiológico De Las Cardiopatías Congénitas</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Pruebas De Citogenética Convencional Y Molecular	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<i>Cariotipo De Alta Resolución</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<i>Hibridación In Situ Con Fluorescencia (Fish)</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Pruebas De Biología Molecular.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Síndromes Por Microdelección	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Síndrome De Delección En 22q11.2.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Frecuencia De Los Signos Encontrados En Los Pacientes Con Síndrome Por Delección En 22q11.2	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Genes Localizados En 22q11 Asociados Al Fenotipo Del Síndrome De Delección En 22q11.2:.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Mecanismo Molecular Que Predispone A La Producción De Deleciones/Duplicaciones En 22q11¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Antecedentes:.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Planteamiento Del Problema.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Justificación¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Pregunta De Investigación.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Objetivo General¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Objetivos Específicos¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Hipótesis.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Material Y Métodos.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Diseño De La Investigación.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Tamaño De Muestra.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Muestreo¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Criterios De Selección.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Criterios De Inclusión¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Criterios De Exclusión.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Métodos.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Análisis De Datos.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Aspectos Éticos.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Financiamiento Y Factibilidad¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Recursos Humanos Y Físicos¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Resultados¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Discusión.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Limitaciones.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Recomendaciones¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Conclusiones¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Bibliografía¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Anexo 1 Consentimiento Informado¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Anexo 2. Técnicas Cromosómicas Y De Citogenética Molecular ¡ERROR!
MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

PAGINA

Tabla1. Frecuencia Relativa De Las Principales Cardiopatías Conotroncales:
.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Tabla 2. Estudios De Búsqueda De Deleción De 22q11 En Pacientes Con
Cardiopatías Congénitas Sindromáticas.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Tabla 3. Estudios De Búsqueda De Deleción De 22q11 En Pacientes Con
Cardiopatías Congénitas Aisladas Y Sindromáticas.¡ERROR! MARCADOR NO
DEFINIDO.

Tabla 4. Revisión Bibliográfica De Estudios De Búsqueda De Deleción De 22q11
En Pacientes Con Cardiopatías Congénitas Aisladas.¡ERROR! MARCADOR NO
DEFINIDO.

Tabla 5. Variable De Estudio.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Tabla 6. Distribución De Los Pacientes De Acuerdo Al Sexo¡ERROR! MARCADOR
NO DEFINIDO.

Tabla 7. Distribución De Los Pacientes De Acuerdo A La Edad ¡ERROR!
MARCADOR NO DEFINIDO.

Tabla 8. Malformaciones Conotroncales De Los Pacientes.¡ERROR! MARCADOR
NO DEFINIDO.

Tabla 9. Frecuencia De Deleción 22q11 En Diferentes Estudios De Niños Con
Malformación Conotroncal.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Figura 1. Algoritmo Que Esquematiza Los Pasos Realizados Durante El Estudio.....

¡Error! Marcador no definido.

Figura 2. Diagrama De Flujo De La Preparación De La Muestra Sanguínea.
.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Figura 3. Diagrama De Flujo De La Hibridación In Situ Con Fluorescencia. ¡ERROR!
MARCADOR NO DEFINIDO.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: En la literatura mundial existe controversia sobre la verdadera frecuencia de las microdeleciones en 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada. En nuestro país no se ha efectuado estudios para conocer su frecuencia por lo que consideramos importante determinarla en los pacientes que acuden a la consulta externa de cardiología del HP del CMN SXXI y cuyo diagnóstico es cardiopatía congénita conotruncal aislada. El conocer la verdadera frecuencia de microdeleciones en estos pacientes nos permitirá identificar si estos pacientes son candidatos a la realización de estudios citogenéticas moleculares desde el momento en que se efectúa el diagnóstico clínico, además de que permitirá otorgar asesoramiento genético a los pacientes estudiados y sus familiares directos.

OBJETIVOS: el objetivo principal es conocer la frecuencia de microdeleciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada en los pacientes evaluados por el servicio de cardiopediatría del HP del CMN SXXI, IMSS, en el periodo comprendido de julio de 2007 a julio de 2008. Los objetivos específicos son determinar mediante FISH la presencia o no de microdeleciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada y dar asesoramiento genético basado en los resultados de las pruebas de citogenética molecular a los pacientes estudiados y sus familiares directos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se trata de un estudio observacional, descriptivo, transversal. Se incluyeron a todos los pacientes pediátricos con diagnóstico de cardiopatía congénita conotruncal aislada referidos por el servicio de cardiopediatría. Se recolectó una muestra total de 15 pacientes, a los cuales se les realizó historia clínica minuciosa, y se les indicó realización de ultrasonido renal, biometría hemática completa y potenciales provocados auditivos o audiometría para descartar anomalías asociadas.

RESULTADOS: Se estudiaron un total de 15 pacientes, de los cuales sólo cuatro presentaron una dismorfia facial única. En ninguno de ellos se encontró delección en 22q11. Las cardiopatías conotruncales encontradas fueron: tetralogía de Fallot

(10 pacientes), transposición de grandes arterias (2 pacientes), doble vía de salida de ventrículo derecho (2 pacientes) y uno con atresia pulmonar con comunicación interventricular.

CONCLUSIONES: No se recomienda la realización de estudio de FISH a los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada. Se sugiere realizar exploración física minuciosa por un genetista clínico de los pacientes con cardiopatía conotruncal aparentemente aislada para descartar la presencia de dismorfias faciales u otras anomalías extracardiacas. Si el paciente cursa con alguna de estas, se indica la realización de estudio molecular para detección de deleción en 22q11. De encontrar un resultado positivo se indica el estudio familiar.

MARCO TEÓRICO

ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS MALFORMACIONES CONOTRONCALES

DEFINICIÓN: las malformaciones conotroncales se han definido como una desviación del patrón de tabicación normal que implica una conexión ventrículo-arterial anormal (1).

También se les ha definido como defectos de la vía de salida del corazón. (2)

Se han dado diversas clasificaciones a las cardiopatías conotroncales, sin embargo la clasificación actual es la siguiente (1):

CLASIFICACIÓN:

- Ausencia o detención de la tabicación:
 - Tronco arterioso (tronco común)
 - Ventana aortopulmonar
- Desviación del patrón de la tabicación con mala participación a expensas de la pulmonar:
 - Tetralogía de Fallot
 - Atresia pulmonar con comunicación interventricular.
- Desviación del patrón de la tabicación normal que implica una conexión ventrículo-arterial anormal:
 - Transposición de las grandes arterias (discordancia ventrículo-arterial)
 - Doble vía de salida del ventrículo derecho (1)

TRONCO ARTERIOSO (TRONCO COMÚN):

Es el resultado de la falta de desarrollo normal de los rebordes troncales y el tabique aortopulmonar, así como la ausencia de división del tronco arterioso en la aorta y tronco pulmonar. En esta anomalía, un único tronco arterial, el tronco arterioso, surge del corazón e irriga las circulaciones sistémica, pulmonar y coronaria. Siempre existe una CIV y el tronco se sitúa sobre la comunicación por lo que recibe sangre de ambos ventrículos (3).

Ambos ventrículos soportan la presión sistémica y ambos bombean sangre hacia el tronco. Si no se trata esta cardiopatía, las resistencias pulmonares aumentan y se presenta cianosis. La válvula troncal en ocasiones es incompetente, lo que complica de forma significativa el tratamiento médico y quirúrgico (3).

En cuanto a la clasificación de tronco arterioso común se han descrito cuatro tipos:

- Tipo I: las arterias pulmonares salen juntas desde el lado izquierdo posterior del tronco arterioso y luego se divide en las arterias pulmonares izquierda y derecha. (3)
- Tipo II: No existe arteria pulmonar principal y las arterias pulmonares izquierda y derecha nacen de orificios separados en la cara posterior (3).
- Tipo III: No existe arteria pulmonar principal y las arterias pulmonares izquierda y derecha nacen de orificios separados en la cara lateral (3).

VENTANA AORTOPULMONAR:

Es una anomalía del tabique aortopulmonar en el que existe una comunicación entre la aorta y el tronco pulmonar cerca de la válvula aórtica. La presencia de válvulas pulmonares y aórticas con el tabique interventricular intacto permite distinguirla del tronco arterioso (3)(1).

TETRALOGÍA DE FALLOT:

Ha sido definida como la presencia de las siguientes características: I) obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho (estenosis pulmonar), II) Comunicación interventricular, III) dextroposición de la aorta con cabalgamiento sobre el tabique y IV) hipertrofia del ventrículo derecho. La obstrucción del flujo de la arteria pulmonar ocurre habitualmente tanto en el infundíbulo ventricular derecho (zona subpulmonar) como en la válvula pulmonar. La obstrucción completa del tracto de salida del ventrículo derecho (atresia pulmonar con CIV) se clasifica como una forma extrema de tetralogía de Fallot (3).

Cuando los neonatos y lactantes presentan síntomas de compromiso cardiovascular y cianosis grave en su primer mes de vida pueden someterse a cirugía en el periodo neonatal o al momento del diagnóstico; los lactantes con cianosis menos intensa que se mantiene con un adecuado crecimiento son programados para cirugía entre los 4 y 12 meses de edad (3).

ATRESIA PULMONAR:

El término atresia significa ausencia de una abertura. En la atresia pulmonar, la válvula pulmonar permanece cerrada. Hay dos tipos de atresia pulmonar: con tabique interventricular íntegro y con comunicación interventricular (3).

El tipo de atresia pulmonar que se considera cardiopatía conotruncal es la que se presenta con comunicación interventricular, ya que se considera que en los pacientes que presentan atresia pulmonar con defecto septal interventricular, el ostium pulmonar se hace atrésico muy temprano en el desarrollo, durante o poco después de que ha tomado lugar la septación de la parte troncoconal del corazón pero antes del cierre del septum ventricular. En cambio, en los pacientes con septum ventricular íntegro, la atresia ocurre después de que la tabicación cardiaca se ha completado. En estos casos, la atresia pulmonar puede estar asociada a un proceso inflamatorio prenatal, en lugar de representar una verdadera malformación congénita (4).

Atresia pulmonar con comunicación interventricular asociada: es una forma extrema de la tetralogía de Fallot. La válvula pulmonar está cerrada, rudimentaria o ausente y el tronco pulmonar es atrésico o hipoplásico. Todo el gasto del ventrículo derecho es bombeado hacia la aorta a través de la comunicación interventricular (3).

TRANSPOSICIÓN DE LAS GRANDES ARTERIAS :

Es una malformación cianótica en la cual las venas sistémicas desembocan con normalidad en la aurícula derecha y las venas pulmonares en la izquierda. Las conexiones entre las aurículas y los ventrículos son también normales

(concordancia aurículoventricular). Sin embargo, la aorta nace del ventrículo derecho y la arteria pulmonar del ventrículo izquierdo. La sangre desaturada que retorna desde todo el organismo al hemicardio derecho se dirige inapropiadamente a la aorta y regresa al organismo, mientras que la sangre oxigenada del retorno venoso pulmonar que llega al hemicardio izquierdo vuelve directamente a los pulmones. Las circulaciones sistémica y pulmonar son dos circuitos paralelos. La supervivencia en estos neonatos depende del agujero oval y del conducto arterioso que permite que se produzca algo de mezcla entre la sangre oxigenada y la desoxigenada. Cerca de la mitad de los pacientes con TGA tienen también una comunicación interventricular que permite una mejor mezcla (3).

Hay de tres tipos:

- Con tabique interventricular íntegro,
- Con comunicación interventricular asociada
- Con comunicación interventricular corregida (3).

DOBLE VÍA DE SALIDA DEL VENTRÍCULO DERECHO:

Es una cardiopatía congénita cianótica en la cual tanto la aorta como la arteria pulmonar nacen del ventrículo derecho. Puede cursar con o sin estenosis pulmonar (3).

EMBRIOLOGÍA DEL APARATO CARDIOVASCULAR

El aparato cardiovascular es el primer sistema importante en funcionar en el embrión. El corazón y el aparato cardiovascular primitivos aparecen a mediados de la tercera semana del desarrollo embrionario. El corazón comienza a funcionar al principio de la cuarta semana. El aparato cardiovascular procede principalmente de (5):

- Mesodermo esplácnico: forma el primordio del corazón.

- Mesodermo paraxial y lateral: se localiza cerca de las placodas óticas (áreas ectodérmicas engrosadas situadas hacia la mitad del rombencéfalo, a partir de la cual se desarrollan los oídos internos (5).
- Células de la cresta neural de la región situada entre las vesículas óticas (primordios de los laberintos membranosos de los oídos internos) y los límites caudales del tercer par de somitas (5).

El primer indicio del corazón es la aparición de unas hileras endoteliales pares, llamadas cordones angioblásticos, en el mesodermo cardiogénico durante la tercera semana del desarrollo. Estos cordones se canalizan y forman los tubos cardiacos, que se fusionan para dar lugar al corazón tubular a finales de la tercera semana. El corazón comienza a latir a los 22-23 días. Una influencia inductora del endodermo anterior estimula la formación inicial del corazón. El flujo sanguíneo se inicia a lo largo de la cuarta semana y se puede visualizar mediante ecografía Doppler (5).

El tubo cardiaco continúa alargándose y comienza a incurvarse a los 23 días. La porción cefálica se pliega en dirección ventral, caudal y derecha, mientras que la porción caudal lo hace en dirección dorsocraneal e izquierda. Este plegamiento da lugar al asa cardiaca, y se completa a los 28 días. Mientras el asa cardiaca se está formando se advierten expansiones locales en toda la longitud del tubo. La porción auricular, que al principio es una estructura para situada por fuera de la cavidad pericárdica, forma una aurícula común y se incorpora a aquella. La unión aurículoventricular es estrecha y constituye el canal aurículo ventricular, que comunica la aurícula común con el ventrículo embrionario primitivo. El bulbo cardiaco es estrecho excepto en su tercio proximal. Esta región formará la porción trabeculada del ventrículo derecho. La porción media, denominada como arterial, formará los infundíbulos (vías de salida) ventriculares. La parte distal del bulbo, el tronco arterioso, originará las raíces y región proximal de la aorta y la arteria pulmonar (6).

ANOMALÍAS DEL CORAZÓN Y LOS GRANDES VASOS:

Las anomalías cardíacas y vasculares se presentan en el 1% de los recién nacidos vivos. Se calcula que el 8% de las malformaciones cardíacas se debe a factores monogénicos, el 6 al 10% a alteraciones cromosómicas, el 2% a factores ambientales y el resto a una interacción compleja entre las influencias genéticas y las ambientales (herencia multifactorial) (7).

En el 33% de los niños con anomalías cromosómicas existe una cardiopatía congénita, incidencia que varía según la alteración cromosómica que se presente (7).

La tetralogía de Fallot es la anomalía más frecuente de la región troncoconal, y se debe a la división desigual del cono, causada por desplazamiento anterior del tabique troncoconal. Esto produce las cuatro alteraciones cardiovasculares características de esta entidad, comentadas previamente. Su frecuencia es de 9.6 por cada 10,000 nacimientos (7).

El tronco arterioso (tronco común) es el resultado de los rebordes troncoconales que no se fusionan ni descienden hacia los ventrículos. En este caso la arteria pulmonar nace por arriba del origen del tronco indiviso. Como los rebordes participan también en la formación del tabique interventricular, el tronco común siempre se acompaña de un defecto en el tabique interventricular. El tronco no dividido cabalga sobre los ventrículos y recibe sangre de ambos lados. Su frecuencia es de 0.8 de cada 10,000 nacimientos (7).

La transposición de las grandes arterias se produce cuando el tabique troncoconal no sigue su curso normal en espiral sino que desciende en línea recta. En consecuencia, la aorta nace del ventrículo derecho y la arteria pulmonar del izquierdo. Su frecuencia es de 4.8 de cada 10,000 nacimientos y a veces se acompaña de un defecto en la porción membranosa del tabique interventricular. Se acompaña por lo común de conducto arterioso persistente. Dado que las

células de la cresta neural contribuyen a la formación de las almohadillas troncales, las lesiones de éstas células pueden provocar defectos cardiacos de la región infundibular (7).

La ventana aortopulmonar es un trastorno raro consecuencia de un defecto localizado en la formación del tabique aortopulmonar (5).

La atresia pulmonar aparece cuando la división del tronco arterioso es tan desigual que el tronco pulmonar carece de luz o no hay ningún orificio a nivel de la válvula pulmonar. La atresia pulmonar con comunicación interventricular constituye una forma extrema de tetralogía de Fallot. Todo el gasto cardiaco del ventrículo derecho se realiza a través de la aorta. El flujo sanguíneo pulmonar depende de la existencia de un conducto arterioso permeable o de vasos colaterales bronquiales (5).

La doble vía de salida del ventrículo derecho se causa por alteración de la tabicación ventrículo-arterial provocando que tanto la aorta como la arteria pulmonar se originen del ventrículo derecho (1).

GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO CARDIACO TEMPRANO

Los genes involucrados en el desarrollo del corazón entre las semanas 3 y 4 del desarrollo, cuando se está dando lugar a la formación del corazón tubular, el asa cardiaca y el troncocono son:

CSX1 (Cardiac-Specific Homeobox 1): se localiza en 5q34, es el homólogo del gen murino *Nkx2.5* y del de *Drosophila* *Nkx2e*. Se ha demostrado que un gen homéotico en *Drosophila*, llamado "tinman" se expresa en el vaso dorsal en desarrollo equivalente al corazón de vertebrados. Las mutaciones en tinman resultan en pérdida de la formación de corazón en embriones, sugiriendo que

tinman es esencial para la formación de corazón en *Drosophila*. De la misma forma, el gen murino *Nkx2.5* se expresa sólo en el corazón a partir de la diferenciación cardíaca y el gen humano *CSX1* se expresa sólo en corazón, sugiriendo de nuevo que este gen juega un papel importante en la formación del corazón humano. Las mutaciones en este gen causan varias cardiopatías congénitas (7).

Este gen interactúa con el gen *TBX5* promoviendo la diferenciación de los cardiomiocitos (7).

El análisis del gen tinman en *Drosophila* indicó que tiene un papel esencial en la especificación de los progenitores del músculo cardíaco en el mesodermo. La expresión continúa hasta la vida adulta. Las mutaciones homocigotas en el gen murino causan letalidad embrionaria temprana (día 23 del desarrollo), con desarrollo cardíaco arrestado en el estadio de corazón tubular, antes de la formación del asa cardíaca (7).

En los humanos, se ha demostrado que mutaciones heterocigotas causan cardiopatías congénitas como tetralogía de Fallot, doble vía de salida de ventrículo derecho, comunicación interventricular, comunicación interauricular, anomalía de Ebstein y otras de la válvula tricúspide y bloqueo aurículoventricular idiopático o asociado a las cardiopatías antes mencionadas (7).

El modelo de herencia propuesto es autosómico dominante con los casos reportados hasta el momento originados por mutación de novo en el paciente (7).

TBX5 (T-Box 5): se localiza en 12q24.1. Es un miembro de la familia filogenéticamente conservada que comparten un dominio de unión al DNA común, la caja T (T-Box). Los genes T-Box son factores de transcripción involucrados en la regulación de los procesos del desarrollo (8).

TBX5 se asocia con *CSX1* y sinérgicamente promueven la diferenciación de los cardiomiocitos. Ambos directamente se unen al promotor del gen *NPPA* (cardiac-specific natriuretic peptide precursor type A) en tándem, y los dos factores de transcripción muestran activación sinérgica (8).

El gen se expresa principalmente en corazón y extremidades, y las mutaciones heterocigotas en humanos son una causa del fenotipo en el síndrome de Holt-Oram (mano-corazón), que se caracteriza por malformaciones de extremidad superior involucrando rayo radial, región tenar y huesos del carpo; una historia personal o familiar de cardiopatías congénitas, más frecuentemente comunicación interauricular tipo ostium secundum y comunicación interventricular, especialmente del septum trabeculado y enfermedades de conducción cardiaca (8).

NPPA (Natriuretic Peptide Precursor): se localiza en 1p36.2 Los péptidos con actividad natriurética están implicados en el control de la homeostasis del volumen del líquido extracelular y los electrolitos. Durante el desarrollo cardiaco la expresión de este gen promueve la formación de cámaras cardiacas a partir del corazón tubular (9).

Se han detectado deleciones de 2pb (pares de bases), heterocigotas, en pacientes con fibrilación auricular familiar (modelo de herencia autosómico dominante) (9).

CSX3 (Cardiac-Specific Homeobox 3): se localiza en 10q24.2, es el homólogo del gen murino *Nk2.3* y del gen de *Drosophila Nkx2c* (10).

Es un miembro de la familia de los factores de transcripción homeodominio NKX, que están implicados en muchos aspectos de la especificación del tipo celular, el mantenimiento de las funciones de los tejidos diferenciados y la determinación temporal y espacial de los patrones del desarrollo. Se expresa principalmente en el mesodermo intestinal, arcos branquiales, epitelio lingual, mandíbula y corazón. Su expresión inicia en la tercera semana del desarrollo (10).

La falta de expresión de un alelo de este gen (haploinsuficiencia) en ratones resulta en alteraciones morfológicas graves a nivel intestinal y esplénico, con letalidad posnatal en los mutantes homocigotos (pérdida de la función de ambos alelos). Este gen es esencial para el desarrollo y funcionamiento normal del intestino delgado y el bazo (10).

CSX2 (Cardiac-Specific Homeobox 2): se localiza en 8p21, es homólogo del gen murino y de *Drosophila Nkx2-6*. Se expresa en corazón y arcos branquiales (11).

Se han reportado casos de una familia de Kuwait con antecedentes de consanguinidad con tronco arterioso, que presentan mutaciones homocigotas en este gen (modelo de herencia autosómico recesivo) (11).

HAND1 y HAND2 (Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 1 and 2): el *HAND2* se localiza en 4q33. Aún no se conoce la localización de *HAND1* (12)(13).

Ambos se expresan en corazón y sus productos, que son factores de transcripción, están implicados en la expansión y diferenciación ventricular (*HAND1* en la diferenciación del ventrículo izquierdo, *HAND2* en la del derecho) (12)(13).

HAND1 se expresa en el corazón fetal y adulto, así como en las membranas extraembrionarias. Los embriones murinos homocigotos mutantes mueren tempranamente, presentando defectos en la diferenciación de células gigantes del trofoblasto y alteraciones cardíacas como falta de progreso más allá del desarrollo del asa cardíaca y diferenciación miocárdica ventricular anormal (12).

HAND2 se expresa en corazón fetal y adulto en humanos. En ratón se requiere para la formación de del ventrículo derecho y las arterias del arco aórtico (13).

GATA4 (GATA-binding protein 4): se localiza en 8p23.1-p22. Las proteínas de unión GATA son un grupo de factores de transcripción estructuralmente relacionados que controlan la expresión génica y la diferenciación en una variedad de tipos celulares. Son proteínas de unión al DNA que reconocen una secuencia consenso conocida como GATA, que es un importante elemento cis en los promotores de muchos genes. Se expresa en vertebrados adultos en corazón, epitelio intestinal y gónadas. Durante el desarrollo fetal se expresa en el endodermo del saco vitelino y en las células involucradas en la formación cardíaca. Este factor puede regular la expresión de genes críticos para la diferenciación y función miocárdica (14).

GATA4 y *CSX1* cooperan específicamente en la activación del gen *NPPA* y otros promotores cardíacos, y físicamente interactúan tanto in vivo como in vitro. *GATA4* interactúa con *TBX5*, y se sugiere la posibilidad de que *GATA4*, *CSX1* y *TBX5* funcionen formando un complejo para regular a algunos genes requeridos para la formación septal cardíaca (14).

Las mutaciones heterocigotas en el gen *GATA4* se asocian a cardiopatías congénitas, especialmente comunicación interauricular. Cardiopatías reportadas hasta el momento asociadas a mutaciones en este gen incluyen tetralogía de Fallot, comunicación interventricular, defectos septales atrioventriculares, engrosamiento de la válvula pulmonar e insuficiencia de las válvulas cardíacas. No se han reportado defectos en la conducción cardíaca ni alteraciones en otros órganos (14).

EPIDEMIOLOGÍA:

Las cardiopatías congénitas se detectan en el 0.5-0.8% de los recién nacidos vivos. La incidencia es mayor en los mortinatos (3-4%), abortos (10-25%) y en los prematuros (2%, excluyendo la persistencia del conducto arterioso) (3).

Se ha calculado que 2-3 de cada 1,000 recién nacidos y lactantes presentan una cardiopatía sintomática en el primer año de vida (3).

Las cardiopatías están entre las anomalías congénitas más frecuentes, ocurriendo aproximadamente en el 1 % de la población de recién nacidos. Los defectos cardiacos conotruncales, los cuales representan del 50-60% de todas las malformaciones cardiacas congénitas, se sabe que tienen un fuerte componente genético. Ocurren ya sea como malformaciones aisladas o en asociación con anomalías extracardiacas (15).

Las malformaciones conotruncales representan de un cuarto a un tercio de todos los defectos cardiacos congénitos aislados (3).

Tabla1. Frecuencia relativa de las principales cardiopatías conotruncales:

Cardiopatía conotruncal	% de todas las cardiopatías
Tetralogía de Fallot	5-7
Transposición de las grandes arterias	3-5
Tronco arterioso	1-2
Doble vía de salida del ventrículo derecho	1-2

Fuente: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson Tratado de Pediatría. 17ª ed. Madrid: Elsevier; 2004.

Se han reportado otras entidades sindromáticas que incluyen en sus características cardiopatías conotruncales además de los síndromes de DiGeorge y velocardiofacial, que sugieren una etiología genética, aunque no se ha determinado si se deben a delección en 22q11. Entre estos síndromes se incluyen los siguientes:

Se han reportado 5 casos a nivel mundial del Síndrome de tetralogía de Fallot en el cual además de la tetralogía de Fallot se ha encontrado retraso del desarrollo (afectando principalmente el lenguaje), fisuras palpebrales cortas e hipoplasia medio facial. Otras anomalías reportadas incluyen hidrocefalia e hipertelorismo. Se sugiere un modelo de herencia autosómico recesivo (16).

Se han reportado 2 casos (padre e hijo) a nivel mundial de atresia pulmonar asociada a comunicación interventricular, proponiendo un modelo de herencia autosómico dominante versus multifactorial para esta entidad. (17).

Se han reportado 2 casos del síndrome de interrupción de arco aórtico, parálisis facial y coloboma de retina. Un tercer caso presentó coartación de la aorta, coloboma macular y síndrome de nevo sebáceo lineal. Se ha propuesto un modelo de herencia autosómico dominante (18).

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

PRUEBAS DE CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL Y MOLECULAR

Usualmente cuando se efectúa el diagnóstico de la presencia de malformaciones conotruncales se realizan en algunos casos pruebas cromosómicas y moleculares a fin de identificar las bases moleculares o cromosómicas de dichas malformaciones, de tal manera que la información obtenida constituye una fuente de información acerca de la posible etiología de la enfermedad para ofrecer asesoramiento genético oportuno a la familia implicada (19).

CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN

Las bandas de rutina, por lo general las GTG de 330 a 550 bandas por complemento haploide, permiten la identificación exacta de cada cromosoma, e incluso de cada región cromosómica; sin embargo algunas patologías resultan de alteraciones citogenéticas muy sutiles a nivel de sub-bandas. En estos casos el bandeo de rutina no es suficiente y se requieren bandas de alta resolución (19).

El cariotipo de alta resolución contempla de 550 a 850 bandas. En la técnica el principio fundamental es detener a las células en la profase o prometafase de la división celular. Para lograrlo se emplean métodos de sincronización del ciclo celular; el más utilizado es el bloqueo en fase S por medio de un exceso de

timidina o por exposición a metotrexate. Una vez bloqueado el ciclo celular por cierto tiempo, se desbloquea cambiando el medio con el agente bloqueador por medio fresco (que puede contener Bromodeoxiuridina) que al incorporarse selectivamente en las bandas de replicación tardía, da lugar a bandas R si se revelan por la metodología descrita para intercambio de cromátides hermanas (ICH). Por lo general se prefiere utilizar bandeo G porque así aumenta la resolución para observar regiones pequeña, hasta de aproximadamente 2 a 3 megabases (19).

El bandeo de alta resolución se emplea para estudiar pacientes en quienes se sospecha un síndrome causado por microalteraciones cromosómicas como las microdeleciones observadas en los pacientes con síndrome de DiGeorge, velocardiofacial o malformaciones conotruncales aisladas. También se usa en los casos en los que se ha detectado una alteración cromosómica, para determinar puntos exactos de ruptura o cuando se sospecha un rearrreglo entre cromosomas específicos (19).

Sin embargo, sólo alrededor del 20-30% de las deleciones en 22q11 son detectadas por estudio citogenético de alta resolución, por lo que en la actualidad se prefiere el empleo de FISH para detectar microdeleciones ya que con esta metodología se detectan el 95% de ellas (20) (21).

HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

La hibridación in situ es una metodología que se basa en la propiedad de apareamiento de las bases Adenina-Timina (A-T) y Guanina-Citosina (G-C) de los ácidos nucleicos; utiliza una secuencia de nucleótidos marcada químicamente con una molécula reportera, que sirve como sonda para localizar un DNA complementario blanco; este puede ser de cromosomas metafísicos o de células en interfase (19).

Los primeros en utilizar la hibridación in situ fueron Pardue, Gall y John, en 1969, quienes utilizaron sondas marcadas por medios radioactivos; la detección se realizaba por medio de autorradiografía. En 1986, Pincel utilizó sondas que obtuvo de la clonación de fragmentos del DNA, modificadas por medios químicos para reemplazar los radioisótopos con moléculas fluorescentes; a esta modificación se le llamó hibridación in situ con fluorescencia o FISH (19).

Las sondas son segmentos de DNA que se modifican químicamente, de manera que en vez de timina se incorpora deoxiuridin-trifosfato (dUTP) marcado con biotina o digoxigenina para hacer una inmunodetección indirecta, o bien se agrega un fluorocromo para lograr una detección directa. La secuencia de bases de la sonda es complementaria a una secuencia que se encuentra en el DNA blanco. Para que pueda hacerse la hibridación entre las dos moléculas de DNA, es necesario desnaturalizar tanto la sonda como el DNA blanco, lo cual se consigue incrementando la temperatura por abajo del punto de fusión; una vez desnaturalizados, se incuban a 37° centígrados para que las dos moléculas de DNA puedan unirse de manera complementaria. Después de realizar la hibridación se lava para quitar la sonda no incorporada o mal apareada y se procede a detectar la sonda, por ejemplo, por medio de avidina conjugada a fluoresceína, en el caso de la sonda marcada con biotina, o bien se observa directamente cuando la sonda está marcada con fluorocromo. Se puede hacer FISH multicolor utilizando diferentes sondas al mismo tiempo y en la misma célula, y usando marcas diferentes para cada sonda. El análisis se practica en un microscopio de fluorescencia con filtros de 3 o 4 bandas que permiten la observación simultánea de varios colores (19).

Aplicaciones:

- a) Detección de aberraciones cromosómicas estructurales, como las translocaciones, deleciones, duplicaciones, inversiones, cromosomas marcadores.

- b) Detección de microdeleciones en pacientes con síndromes de genes contiguos como son los siguientes síndromes: de Williams, de Smith-Magenis, Prader-Willi/Angelman, DiGeorge/Velocardiofacial, por delección de 1p36.
- c) Detección de aberraciones subteloméricas en pacientes con retraso mental sin causa aparente.
- d) FISH en células en interfase para el diagnóstico prenatal de las aneuploidías más frecuentes como son las de los cromosomas 21, 13, 18, X y Y.
- e) Diagnóstico preimplantación de las aneuploidías más frecuentes para las pacientes que se someten a fertilización in vitro.
- f) Detección de translocaciones específicas en el cáncer humano.
- g) Análisis de ganancia o pérdida de cromosomas o regiones cromosómicas en tumores.
- h) Detección de delección de genes supresores de tumor o amplificación de oncogenes.
- i) Estudio de mosaicismo y su efecto en el desarrollo humano temprano (22).

Existe un solo reporte en la literatura internacional acerca de la presencia de microdeleciones en 22q11.2 por FISH en 30% de las cardiopatías conotruncales aisladas y en 95% de las malformaciones conotruncales asociadas con datos fenotípicos de síndrome de DiGeorge o síndrome velocardiofacial (22).

El FISH detecta deleciones de un tamaño de por lo menos 1.5Mb, con lo cual se logra detectar a la mayoría de los pacientes con delección en 22q11, ya que el 90% presenta deleciones mayores a este tamaño, ya sea la delección de mayor tamaño de 3Mb, o la de menor tamaño de 1.5-2Mb (22).

Sin embargo, el resto de los pacientes presenta deleciones menores que no son detectados por el FISH, incluso deleciones en un solo gen de este locus, como la delección de 23 pb en el gen TBX1 que provoca este fenotipo. Para estos casos se

recomienda la realización una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) cuantitativa (23).

PRUEBAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde (24).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (24).

El proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Los termocicladores más antiguos que carecían de este sistema, solucionaban el problema de la condensación con una capa de aceite en la parte superior de la mezcla de reacción o con un poco de cera dentro de los tubos (24).

Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de DNA para la secuenciación, la

filogenia basada en DNA, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y pruebas de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas (24).

PCR tiempo real

Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original (25).

Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en técnicas basadas en sondas específicas (25).

En las técnicas basadas en fluorocromos, el DNA, que se ve multiplicada su cantidad con cada ciclo se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para RealTime PCR. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar primers normales para su realización. Es mucho más económica que la realización de Realtime PCR con sondas específicas (25).

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse), cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (25)

La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la PCR realizada en tiempo real (RT-PCR), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación DNA al final de un número predeterminado de ciclos, con RT-PCR

esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de DNA formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Existe una amplia oferta de aparatos en el mercado. La mayoría pueden trabajar con las diversas opciones de marcado fluorescente y son "abiertos", es decir, permiten programar las condiciones de amplificación y lectura de forma que su uso no queda limitado a unos reactivos determinados (25).

Hay un gran número de aplicaciones para la RT-PCR. Se usa tanto con fines diagnósticos como de investigación. Con fines diagnósticos detecta rápidamente la presencia de genes involucrados en anomalías genéticas, cáncer e infecciones. A nivel de investigación se usa principalmente para proporcionar medidas cuantitativas altamente sensibles de transcripción génica (25).

La tecnología puede ser usada para determinar cómo cambia la expresión génica de un gen en particular con el tiempo, tal como la respuesta de un tejido o cultivo celular a la administración de un fármaco, progresión de la diferenciación celular, o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (25).

Es muy útil para detectar deleciones pequeñas que no podrían ser detectadas por el FISH (menores a 1.5 Mb) y tampoco por la PCR clásica, ya que con ésta técnica obtendría un falso negativo en la búsqueda de deleción de un solo locus o gen, al amplificar el que sí está presente (el no deletado). Al cuantificar la cantidad de producto amplificado se detecta una cantidad menor de lo esperado cuando hay una deleción, ya que se espera encontrar los productos amplificados de ambas regiones analizadas (loci o genes) (26).

SÍNDROMES POR MICRODELECIÓN

Schmickel fue el primero que definió el síndrome de genes contiguos en 1986. Estos son síndromes que involucran la deleción de un segmento contiguo de DNA, incluyendo múltiples genes, en un cromosoma. También se les conoce como

síndromes por microdelección o aneusomía segmentaria. Estos síndromes se reconocen clínicamente con características físicas, mentales y de comportamiento distintivo y a menudo involucran características individuales que pueden ser heredados con un modelo de herencia mendeliano (lisencefalia, defectos cardiacos) (22).

Ningún otro tipo de anomalía citogenética se ha beneficiado más de la introducción del FISH que estos síndromes. Mientras algunas de las anomalías pueden ser detectadas citogenéticamente, el FISH se ha añadido dramáticamente a la detección de estos desórdenes y deben ser usados siempre que sea posible para confirmar la delección (22).

SÍNDROME DE DELECCIÓN EN 22q11.2

Este es el síndrome por microdelección más común, con una incidencia estimada de 1:4,000 nacimientos. Las características clínicas del síndrome de delección en 22q11 son extremadamente variables, se incluyen: voz nasal, problemas de aprendizaje, convulsiones hipocalcémicas, hipoplasia del timo que conduce a disminución de las células T. Las características típicas incluyen: paladar hendido, nariz prominente con raíz nasal cuadrada y microcefalia (22).

- **SÍNDROME DE DIGEORGE (DGS):** en esta entidad son más características las anomalías del tercer y cuarto arco faríngeo que conduce a hipoplasia de timo y glándulas paratiroides (23).

Comprende la hipocalcemia que se origina de la hipoplasia paratiroidea, ausencia de timo que conduce a leucopenia e infecciones de repetición y cardiopatías conotruncales. Las alteraciones de la migración de las células de la cresta neural cervical en los derivados de los arcos y bolsas faríngeas provocan parte del fenotipo. La mayoría de los casos resulta de una delección en 22q11.2 (23)

Otras alteraciones que provocan este fenotipo incluyen: deleciones en 10p13, en 17p13, en 5p, en 18q, duplicaciones en 1q y 8q; teratógenos

como embriopatía diabética, por ácido retinoico, síndrome de alcoholismo fetal (23).

- **SÍNDROME VELOCARDIOFACIAL (VCF) O DE SHPRINTZEN** en este síndrome son más características las anomalías palatinas y faríngeas. Los hallazgos más frecuentemente reportados son: paladar hendido, úvula bífida, dificultad para deglutir, insuficiencia velofaríngea, dismorfias faciales, cardiopatías congénitas (más frecuentemente comunicación interventricular y conotruncales como tetralogía de Fallot), problemas de aprendizaje. Menos frecuentemente se encuentra microcefalia, retraso mental, talla baja, hernia inguinal y dismorfias auriculares menores (27).
- **SÍNDROME DE TAKAO:** la presentación predominante es con cardiopatías conotruncales congénitas y dismorfias faciales sin la presentación de hipocalcemia, deficiencia de células T y anomalías palatinas y faríngeas habituales de síndrome de DiGeorge y velocardiofacial (23).
- **SÍNDROME DE CAYLER CARDIOFACIAL:**
Este síndrome se caracteriza por la presencia de parálisis facial unilateral parcial, hipoplasia del músculo depresor del ángulo de la boca y presencia de anomalías cardiovasculares como comunicación interventricular, tetralogía de Fallot, persistencia del conducto arterioso (8).

Otras alteraciones asociadas incluyen: microcefalia, falla de medro, retraso del desarrollo, anomalías genitourinarias, gastrointestinales, esqueléticas, del sistema nervioso central y dismorfias faciales (8).

Se ha encontrado deleción en 22q11 en la mayoría de los casos reportados. Se encontró en un paciente una inversión pericéntrica del cromosoma 15 (8).

El modelo de herencia propuesto por la presentación familiar de diversos casos reportados es autosómico dominante (8).

- Se ha reportado una gran variabilidad clínica en el síndrome de delección en 22q11, desde el cuadro clínico completo con cardiopatías conotruncales, dismorfias faciales, retraso mental, trastornos psiquiátricos, infecciones de repetición secundarias a déficit de linfocitos T, hipocalcemia y tetania y alteraciones velofaríngeas hasta sólo la presencia de dismorfias faciales leves o anomalías cardiovasculares no sintomáticas (28).
- Se realizó un estudio de la variabilidad clínica intrafamiliar para delección en 22q11 en donde se reportó la madre de un paciente con la presentación clínica completa que sólo presentaba nariz tubular y dismorfias auriculares leves sin otras alteraciones que presentaba la delección en 22q11. La madre de otro paciente con el cuadro clínico completo no presentaba dismorfias faciales pero al realizársele un ecocardiograma se le detectó una arteria subclavia derecha retroesofágica y delección en 22q11, lo que hace sugerir a los autores de este estudio realizar exploración física minuciosa de los padres de los pacientes con delección en 22q11 para detectar dismorfias faciales menores, realización de ecocardiograma para detección de anomalías cardiovasculares no sintomáticas y en caso de encontrar hallazgos a estos niveles, realización de FISH para búsqueda de delección en 22q11 (28).
- Se ven frecuentemente asociados con esta delección los defectos cardiacos congénitos (85% de los pacientes), más a menudo un defecto conotruncal. También se ha encontrado delección en 22q11 en malformaciones conotruncales aisladas. Por lo tanto, se sugiere que si alguno de estos defectos estructurales se encuentra prenatalmente por ultrasonografía, se debe realizar FISH para 22q11 (22).
- Solo alrededor del 20-30% de las delecciones en 22q11 son detectadas por estudio citogenético de alta resolución. Con el FISH se detectan 95% de las delecciones, por lo que es necesario utilizar FISH. La sonda comercial más frecuentemente utilizada es TUPLE (22).

FRECUENCIA DE LOS SIGNOS ENCONTRADOS EN LOS PACIENTES CON SÍNDROME POR DELECIÓN EN 22q11.2

Ninguno de los hallazgos ocurre en una frecuencia del 100%, indicando que no hay características patognomónicas u obligatorias. Sin embargo, hay algunas características cardinales que deben originar una fuerte sospecha. En la etapa de recién nacido y lactante, la asociación de paladar hendido y cardiopatías conotruncales es una indicación fuerte para sospechar síndrome velocardiofacial, ya que es el síndrome más frecuentemente asociado con paladar hendido y cardiopatía conotruncal. El síndrome velocardiofacial es el segundo síndrome más común asociado con secuencia de Robin (después del síndrome de Stickler), por lo tanto, un diagnóstico de secuencia de Robin debe originar sospecha de delección en 22q11 (29).

Las cardiopatías están presentes en 85-95% de los pacientes, siendo la más común la comunicación interventricular (62%), el arco aórtico derecho (52%), el arco aórtico interrumpido tipo B (30-50%), anomalías de la arteria carótida interna (25%), el tronco arterioso persistente (24%) y la tetralogía de Fallot (21%) (30)(23).

El desarrollo psicomotor es normal o con problemas de aprendizaje leves en 62% de los pacientes, problemas de aprendizaje de moderados a graves en 18%. El coeficiente intelectual generalmente es de 70-90. Se presentan problemas psiquiátricos en 15-30% de los pacientes (esquizofrenia, trastorno de déficit de atención e hiperactividad, trastorno bipolar). En cuanto al crecimiento, la talla es baja en 36% de los casos (30).

Las dismorfias cráneo-faciales se presentan en 60% de los pacientes, incluyendo: hipertelorismo, fisuras palpebrales cortas, puente nasal prominente, nariz tubular, raíz nasal cuadrada, punta nasal bulbosa, hipoplasia del alae nasi, filtrum corto, boca pequeña, paladar alto arqueado, orejas de implantación baja, hélix plegado, otras dismorfias auriculares (23).

El paladar hendido es una característica muy frecuente (80%). La forma de presentación más habitual de esta anomalía es el paladar hendido submucoso manifestado por úvula bífida (44%), seguido por el paladar hendido submucoso oculto que no se detecta por la exploración oral habitual. Se diagnostica por nasofaringoscopia al detectarse ausencia de músculos palatinos y hendiduras en el paladar, pero no es un examen que se realice de rutina. La única manifestación de estas anomalías palatinas no detectadas es la voz hipernasal, que reflejan una deficiencia tisular grave (presente en 70% de los pacientes). La forma de presentación de paladar hendido menos frecuente (18%) es el defecto francamente visible a la exploración física (29).

El 75% de los pacientes cursan con otitis media de repetición, que frecuentemente se acompaña de hipoacusia conductiva. En el 15% de los casos hay una hipoacusia neurosensorial (29).

La hipocalcemia transitoria neonatal se ve en 60% de los casos, presentando crisis convulsivas secundarias a ésta el 21% de los pacientes (30).

A nivel inmunológico, el 45% de los pacientes presenta disminución en el número de células T. Las infecciones de repetición son principalmente de tipo respiratorio, tanto de vías superiores como inferiores, presentándose con más frecuencia en la niñez temprana (nacimiento hasta los 4 años de edad), disminuyendo posteriormente la frecuencia (29).

Los pacientes pueden presentar defectos de pared (hernia umbilical o inguinal) y malformaciones renales con menor frecuencia (29).

GENES LOCALIZADOS EN 22q11 ASOCIADOS AL FENOTIPO DEL SÍNDROME DE DELECIÓN EN 22q11.2:

TBX1 (T-Box 1): se expresa en la vida embrionaria en las bolsas y arcos faríngeos y la vesícula ótica. Más tardío en el desarrollo se expresa en la columna vertebral y las yemas dentales. Codifica para un factor de transcripción que contiene la caja T, involucrado en la regulación de los procesos del desarrollo (31).

Las mutaciones puntuales o deleciones en este gen son responsables de las dismorfias faciales, cardiopatías, hipoplasia tímica, insuficiencia velofaríngea con paladar hendido y la disfunción hipoparatiroidea con hipocalcemia. No causan el retraso mental comúnmente visto en estos pacientes (31).

Se reportó una deleción heterocigota de 23pb en el gen en una madre y dos hijos con síndrome velocardiofacial. La madre presentaba depresión mayor, por lo cual se ha sugerido como un gen candidato para la enfermedad psiquiátrica en los pacientes con DGS y VCFS (31).

TUPLE1 (Tup-like enhancer of split 1): codifica para un regulador transcripcional putativo con una secuencia similar al del gen de levadura *TUP1*. El gen se considera símbolo de la DGCR1 (región crítica del síndrome de DiGeorge 1) (32).

El cDNA de *TUPLE1* presenta una gran homología de secuencia con los genes de *S. cerevisiae* *HIR1* y *HIR2*, los cuales son represores transcripcionales. A este cDNA se le llamó *HIRA* (32).

El homólogo de pollo *Hira* se expresa en la placa neural en desarrollo, el tubo neural la cresta neural y el mesénquima de la cabeza y arcos branquiales, por lo que se sugiere interviene en el fenotipo de los pacientes con deleción en 22q11 (32).

Este gen interviene en algunos aspectos del metabolismo de la cromatina y las histonas (32).

Es el gen al cual va dirigido la sonda TUPLE1 usada en la realización del FISH para detección de la mayoría de las deleciones en 22q11, de 2 Mb de longitud. La sonda es de 120 Kb y comprende al gen *TUPLE1* y DNA flanqueante. La sonda es de color rojo (32).

Se emplea además una sonda específica de secuencia subtelomérica del brazo largo del cromosoma 22 (22qter), que sirve como control. La sonda es de color verde (32).

Detectar dos señales verdes en una célula en interfase o en una metafase indica que efectivamente estamos visualizando ambos cromosomas 22 (32).

Detectar dos señales rojas en una célula en interfase o en una metafase indica que el paciente presenta sus dos regiones 22q11, esto es lo normal (resultado negativo). Detectar una sola señal roja indica deleción de una de las dos regiones 22q11 de esta longitud (resultado positivo). El FISH no detecta deleciones de menor tamaño que ocasionalmente pueden presentar los pacientes, por lo que para los casos en los que se sospecha deleción en 22q11 con un FISH negativo se necesita otra metodología. La metodología empleada en estos casos es el PCR cuantitativo (32).

DGCR2 (DiGeorge síndrome critical region gene 2): también llamado Integral membrane protein deleted in DiGeorge síndrome (IDD). Codifica para un receptor de proteínas de adhesión. Los niveles alterados de receptores de adhesión asociados a la haploinsuficiencia de la proteína DGCR2 podría interferir con la migración de las células de la cresta neural. Las células de la cresta neural contribuyen a la septación aortopulmonar y a la morfogénesis del timo y las paratiroides, por lo que se ha sugerido que la haploinsuficiencia de este gen contribuye al fenotipo cardiaco, de inmunodeficiencia de células T y de hipocalcemia de los pacientes con deleción en 22q11 (33).

ARVCF (Armadillo repeat gene deleted in VCFS): codifica para una proteína relacionada con la familia de la catenina. Miembros de esta familia juegan papeles importantes en la formación de complejos de unión. Esta información sugiere que el gen *ARVCF* está involucrado en interacciones proteína-proteína en las uniones adherentes. Se expresa ubicuamente en los tejidos fetales y adultos. Este gen se localiza en la región de 22q11 que está hemicigota en todos los pacientes con VCFS/DGS que tienen deleciones intersticiales, por lo que se sugiere que juega un papel en algunos de los fenotipos asociados con VCFS (34).

SLC25A1 (Solute carrier family 25, mitochondrial carrier. Citrate transporter, member 1): codifica para un transportador mitocondrial de tricarboxilato, responsable del movimiento de citrato a través de la membrana mitocondrial interna (35).

Las mutaciones heterocigotas del gen humano puede contribuir al retraso mental de los pacientes con la deleción (35).

MRPL40 (Mitochondrial ribosomal protein L40): también llamado Nuclear localization signal deleted in velocardiofacial síndrome (*NLVCF*), codifica para una proteína de localización nuclear. En el ratón, el gen *Nlvcf* se expresa en la mayoría de los tejidos embrionarios en desarrollo, excepto el corazón. Los mayores niveles de expresión se detectan en la prominencia frontonasal, la región que se localiza sobre el cerebro anterior, primer y segundo arcos faríngeos y el tubo neural. Posteriormente se observa expresión en las yemas de las extremidades superiores e inferiores. Se sugiere participación en el fenotipo facial y de extremidades de los pacientes con deleción, sin intervenir en las cardiopatías (36).

DVL1L1 (Dishevelled 1-like 1): es homólogo del de *Drosophila dsh*, el cual es un gen de polaridad segmentaria. Se ha encontrado deletado en los pacientes con DGS. Se expresa en varios tejidos fetales y adultos, incluyendo el timo y, en niveles elevados, el corazón, lo que sugiere puede estar involucrado en la patogénesis de DGS (37).

COMT (Catechol-O-Methyltransferase): su producto, la enzima del mismo nombre, cataliza la transferencia del grupo metilo desde la S-adenosilmetionina a las catecolaminas, incluyendo los neurotransmisores dopamina, epinefrina y norepinefrina. Esta O-metilación resulta en una de las principales vías degradativas de los transmisores de catecolamina. Además de su papel en el metabolismo de sustancias endógenas, la COMT es importante en el metabolismo de fármacos catecolaminérgicos usados en el tratamiento de la hipertensión arterial, el asma y la enfermedad de Parkinson (38).

Modelos murinos con mutaciones en el gen lo han implicado en el fenotipo de los pacientes con delección en 22q11. Las hembras con mutaciones homocigotas (no los machos) muestran alteraciones en las reacciones emocionales en respuesta al modelo exploratorio de ansiedad de oscuridad/luz. Los machos heterocigotas exhiben aumento del comportamiento agresivo. Con esto se concluyó la contribución de *COMT* del mantenimiento de niveles estables de catecolaminas en el cerebro, con diferencias sexuales y específicas de región, sugiriendo un papel de *COMT* en algunos aspectos del comportamiento social y emocional de los ratones (38).

En humanos, el gen *COMT* es un gen candidato para las manifestaciones psiquiátricas de los pacientes con delección en 22q11, como son la esquizofrenia, el trastorno de déficit de atención e hiperactividad y el trastorno bipolar, así como en un subtipo de éste último, el desorden de pánico comórbido (38).

DGCR8 (DiGeorge síndrome critical region gene 8): codifica para una RNAasa III nuclear, que interviene en la biogénesis de microRNA (miRNA). El gen se expresa en el neuroepitelio cerebral, yemas de extremidades, vasos sanguíneos, timo y paladar (39).

Modelos murinos con mutaciones heterocigotas en el gen a alteraciones en la biogénesis de miRNA y de la complejidad dendrítica. Los machos, pero no las

hembras, se muestran temerosos de explorar su ambiente. Machos y hembras muestran hiperactividad. El procesamiento anormal de los miRNA contribuye a los defectos de comportamiento y neuronales asociados a delección en 22q11.2 (39).

DGCR6 (DiGeorge síndrome critical region gene 6): codifica para una proteína que muestra homología con la proteína gonadal de *Drosophila* (gdl). Se ha postulado como un gen candidato involucrado en la patología del síndrome (40).

DGCR14 (DiGeorge síndrome critical region gene 14): es homólogo al gen murino *Es2*, cuya máxima expresión en vida embrionaria es a nivel del puente del tallo cerebral, con niveles menores a nivel de cerebro, médula espinal, cara, corteza renal y timo. Es esencial para el desarrollo embrionario de los ratones. Se sugiere como gen candidato de algunos rasgos fenotípicos de los pacientes con delección en 22q11 (41).

MECANISMO MOLECULAR QUE PREDISPONE A LA PRODUCCIÓN DE DELECCIONES/DUPLICACIONES EN 22q11

Los seres humanos son portadores de dos copias de cada cromosoma. Durante la formación de células germinales, estas dos copias tienen que reducirse a una por un proceso llamado meiosis. Muy temprano en la meiosis, cada uno de los dos cromosomas homólogos se alinean y sufren eventos de entrecruzamiento por mecanismos de recombinación homóloga, creando diversidad genética. Defectos en este paso, aunque importantes para la evolución, resultan en desórdenes humanos. La mala alineación de los cromosomas durante la meiosis conduce a delecciones o duplicaciones causando una alteración en la dosis génica normal resultando en enfermedad genética. La mala alineación entre pequeños bloques de secuencias duplicadas resulta en desórdenes monogénicos. La mala alineación entre grandes bloques de secuencias duplicadas pueden causar rearrreglos de grandes regiones (1 a 5 millones de pares de bases), conteniendo genes contiguos, resultando en desórdenes genómicos. El impacto global de tales desórdenes genómicos mediados por mala alineación cromosómica es mayor a 1 por mil recién nacidos. Cada desorden genómico tiene un set particular de

hallazgos clínicos característicos delineados como síndromes. La asociación de un síndrome genético con el rearrreglo de un intervalo genómico puede ser identificado examinando la estructura cromosómica, ya sea con citogenética convencional o con FISH (42).

Los síndromes de DiGeorge y velocardiocfacial se asocian con una delección heterocigota en 22q11. Más del 90% de los pacientes presentan una delección de 3Mb, mientras algunos tienen una delección distal de menor tamaño (1.5 Mb). Agrupamientos de repetidos de bajo número de copias (Low Copy Repeats, LCR por sus siglas en inglés) de 200 Kb, que presentan una homología mayor al 98% en sus secuencias, flanquean los puntos en 22q11 donde ocurren las delecciones. Las delecciones/duplicaciones ocurren por eventos de recombinación homóloga intra e intercromosómicas. Existen un total de 8 LCRs flanqueando a 22q11, con orientación directa e invertida. Tanto el gran número de LCRs, como su complicada orientación, confiere una multitud de posibilidades para que se produzcan rearrreglos (42).

ANTECEDENTES:

Se han reportado en la literatura internacional diversos estudios en los que se han realizados estudios moleculares y cromosómicos de los pacientes con malformaciones cardiacas congénitas conotruncales en busca de la presencia de microdelección en 22q11.2. A continuación se resumen los datos obtenidos de la revisión bibliográfica efectuada.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE ESTUDIOS DE BÚSQUEDA DE DELECIÓN DE 22q11 EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS SINDROMÁTICAS.

Tabla 2. Estudios de búsqueda de delección de 22q11 en pacientes con cardiopatías congénitas sindromáticas

AUTOR	REFERENCIA	DESCRIPCIÓN	CARDIOPATÍA ENCONTRADA	CARDIOPATÍA VS DELECIÓN 22q11
Trost, D.	Trost D, Engels H, Bauriedel, G.(1995).	Se detectó delección de	20 CIV	2/20 (10%)
Engels, H.	Congenital cardiovascular malformations	22q11.2 en 14/90 (15.5%) de	10 atresia pulmonar	
Bauriedel, G.	and chromosome microdeletion in 22q11.2. Dtsch Med Wochenschr. 124 (1-2): 3-7. PMID:9951451 (PUBMED)	los pacientes con cardiopatía sindromática (DGS/VCFS).	9 TOF 6 tronco arterioso común 6 canal A-V	1/9 (11%)

			5 arco aórtico interrumpido tipo B	5/5 (100%)
			5 CIA	1/5(20%)
			4 atresia tricuspídea	
			4 Sx corazón izquierdo hipoplásico	NOTA: en el abstract sólo se especifican 9 de las 14 deleciones encontradas.
			3 PCA	
			3 estenosis válvula pulmonar	
			2 bloqueos A-V completos	
			1 anomalía de Ebstein	
			1 taquicardia	
			1 aurícula derecha agrandada	
			6 estenosis válvula aórtica	
			4 con cardiopatía compleja	
			no clasificada	
Khositseth, A.	Khositseth A, Tocharoentanaphol C,	Se detectó deleción de	32 TOF	1/32 (3.1%)
Tocharoentanaphol, C.	Khowsathit P. (2005). Chromosome	22q11 en 9/51 pacientes (17.6%) con cardiopatía	12 atresia pulmonar/CIV	4/12 (33.3%)
Khowsathit, P.	22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects. Pediatr Cardiol. 26 (5): 570-3. PMID: 16132309 (PUBMED).	sindromática (DGS/VCFS)	5 doble salida ventrículo derecho	0/5
			4 TGA	2/4 (50%)
			4 tronco arterioso	1/3 (33.3%)
			3 CIV subpulmonar	1/1 (100%)
			1 arco aórtico interrumpido tipo B	
Maeda, J.	Maeda J, yamagishi H, Matsuoka R.	Se detectó deleción en		
Yamagishi, H.	(2000). Frequent association of 22q11.2 deletion with tetralogy of Fallot. Am J Med Genet. 92 (4): 269-72. PMID: 10842294 (PUBMED).	22q11 en 28/212 (13.2%) de los pacientes con tetralogía de Fallot y una o más anomalías extracardiacas, Principalmente broncomalacia.		

Tabla 3. Estudios de búsqueda de deleción de 22q11 en pacientes con cardiopatías congénitas aisladas y sindromáticas.

Hou, J.	Hou J, Wang J, Tsai W. (1997). CATCH	Se estudiaron 30 pacientes,
Wang, J.	22: deletion of locus 22q11 in	con cardiopatía aislada (24) y
Tsai, W.	velocardiofacial syndrome, DiGeorge anomaly, and nonsyndromic conotruncal defects. J Formos Med Assoc. 96 (6): 419-23.	sindromática (6). 11/24 (45.8%) con cardiopatía aislada presentaban deleción; 5/6 (83.3%) con cardiopatía

		sindromática presentó deleción. 1 paciente sindromático presentó deleción en 10p13.
Worthington, S.	Whorthington S, Bower C, Harrop K.	Se estudiaron 90 pacientes
Bower, C.	(1998). 22q11 deletions in patients with	con cardiopatías aisladas
Harrop, K.	conotruncal heart defects. J Paediatr	y sindromáticas. Se detectó
	Child Health. 34 (5): 438-43.	deleción en 22q11 en 15/15
	PMID: 9767506 (PUBMED).	(100%) de los pacientes con
		cardiopatía sindromática.
		En los 75 pacientes con
		cardiopatía aislada no se
		detectó deleción en 22q11.

Tabla 4. Revisión bibliográfica de estudios de búsqueda de deleción de 22q11 en pacientes con cardiopatías congénitas aisladas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE ESTUDIOS DE BÚSQUEDA DE DELECIÓN DE 22q11 EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS AISLADAS.

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN	CARDIOPATÍA ENCONTRADA	CARDIOPATÍA VS DELECIÓN 22q11
Lu J, Chung M, Betau H. (2001). Molecular characterization of tetralogy of Fallot within DiGeorge critical region of the chromosome	Se detectó deleción en 22q11 en 14/84 (16.6%) de los pacientes con tetralogía de fallot aislada.	84 pacientes con tetralogía de Fallot.	14/84 (16.6%).
22. Pediatr Cardiol. 22 (4): 279-84. PMID: 11455393 (PUBMED).			
Kessler-Icekson G, Birk E, Weintraub A. (2002). Association of tetralogy of Fallot with a distinct region of del22q11.2.	Se estudiaron tejidos miocárdicos de 31 pacientes con cardiopatía aislada, detectándose en 10 de ellos deleción en 22q11.2 (32.2%).	21 pacientes con tetralogy of Fallot. 10 pacientes con doble salida de ventrículo derecho.	10/21 (48%) 0/10
Am J Med Genet. 107 (4): 294-8. PMID: 10842294 (PUBMED).			
Goldmuntz E, Driscoll D, Budarf M. (1993). Microdeletions of chromosomal	Se estudiaron 17 pacientes con cardiopatía conotruncal aislada. Se		

region 22q11 in patients with conotruncal cardiac defects. J Med Genet. 30 (10): 807-12.PMID: 7901419 (PUBMED).	detectó delección en 22q11 en 5/17 (29.4%).		
Jiang L, Duan C, Chen B. (2005). Association of 22q11 deletion with isolated congenital heart disease in three Chinese ethnic groups. Int J Cardiol. 105(2): 216-23.PMID: 16243116 (PUBMED):	Se detectó delección en 22q11 en 4/19 pacientes (21%) con cardiopatía aislada.	4 pacientes con Tetralogía de Fallot 5 pacientes con CIV 5 pacientes con CIA 5 pacientes con PCA	2/4 (50%) 1/5 (20%) 0/5 (0%) 1/5 (20%)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Previo a este estudio no se habían efectuado estudios amplios y detallados en población infantil mexicana para conocer la verdadera frecuencia de microdelecciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada.

JUSTIFICACIÓN

En la literatura mundial hay controversia sobre la verdadera frecuencia de las microdelecciones en 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada. En nuestro país no se habían efectuado estudios para conocer su frecuencia por lo que consideramos importante determinarla en los pacientes que acuden a la consulta externa de cardiología del HP del CMN SXXI y cuyo diagnóstico es cardiopatía congénita conotruncal aislada. El conocer la verdadera frecuencia de microdelecciones en estos pacientes nos permitirá identificar si estos pacientes son candidatos a la realización de estudios citogenéticas moleculares desde el momento en que se efectúa el diagnóstico clínico, además de que

permitirá otorgar asesoramiento genético a los pacientes estudiados y sus familiares directos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de microdeleciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada en pacientes del HP del CMN SXXI, IMSS?

OBJETIVO GENERAL

Conocer la frecuencia de microdeleciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada en pacientes del HP del CMN SXXI, IMSS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar mediante FISH la presencia de microdeleciones de 22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada en pacientes del HP del CMN SXXI, IMSS.

Dar asesoramiento genético basado en resultados de pruebas de citogenética molecular a los pacientes estudiados y sus familiares directos.

HIPÓTESIS

La frecuencia de microdeleciones en 22q11 de pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada en pacientes del HP del CMN SXXI, IMSS es mayor o igual a 30%.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, transversal.

TAMAÑO DE MUESTRA

El cálculo del tamaño de muestra se efectuó con el programa StatCalc de Epi Info™ versión 3.3.2 con los siguientes parámetros: Población de estudio= 120(promedio de pacientes diagnosticados con cardiopatía congénita conotruncal en un año en el HP del CMN SXXI), $\alpha=0.05$ para una hipótesis de una cola, magnitud=0.10, frecuencia esperada=0.30 (basado en literatura internacional). Total de pacientes para probar hipótesis de una cola con significancia de 0.05= 31.

MUESTREO

Se efectuó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

Todos los pacientes de 2-16 años de edad, hombres y mujeres, con diagnóstico de cardiopatía congénita conotruncal aislada del HP CMN SXXI, IMSS en el periodo comprendido entre el 1 de julio de 2007 al 30 de junio de 2008.

Los pacientes que se encontraban en tratamiento con antibióticos que pueden interferir con el crecimiento de los cultivos celulares (aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol), se pospuso la toma de la muestra hasta que concluyeron su tratamiento antibiótico.

Criterios de exclusión

Pacientes con cardiopatía congénita conotruncal sindromática. No se incluyeron recién nacidos ni lactantes debido a la dificultad de realizar estudios psicológicos como la determinación del coeficiente intelectual para descartar retraso mental en estos pacientes.

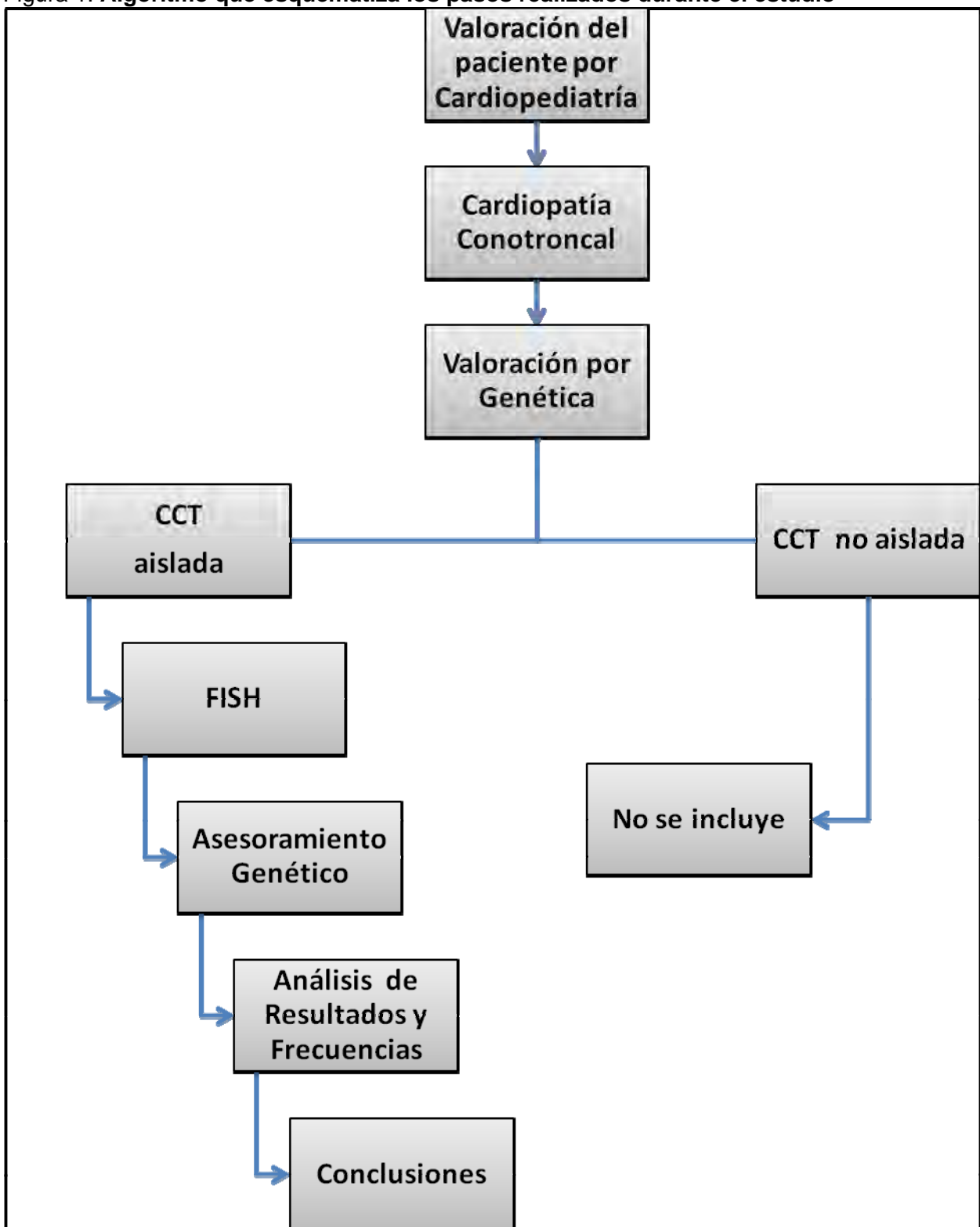
Tabla 5. Variable de estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Microdelección 22q11	Pérdida de la región cromosómica 22q11 identificada mediante FISH	Nominal dicotómica	0= ausente 1= presente

MÉTODOS

Se realizó la exploración física de los pacientes en el servicio de Cardiopediatría del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI por parte de los médicos cardiólogos de dicho servicio quienes detectaron las cardiopatías conotruncales en los pacientes. Al detectar una cardiopatía conotruncal se solicitó la valoración del paciente por los médicos del servicio de Genética clínica, quienes determinaron si la cardiopatía conotruncal era aislada o sindrómica. Si la cardiopatía era sindrómica, se excluyó del protocolo de investigación. Si la cardiopatía era aislada, se incluyó en el estudio y se realizó la toma de muestra de 2 ml de sangre periférica para la realización de FISH en la región cromosómica 22q11. Posterior al resultado se citó a los padres del paciente para asesoramiento genético, independientemente de que se encontrara la delección o no. Finalmente se analizaron los resultados para conocer la frecuencia de la delección y se realizaron las conclusiones.

Figura 1. Algoritmo que esquematiza los pasos realizados durante el estudio



La descripción detallada de las técnicas cromosómicas y de citogenética molecular se encuentra en anexos.

ANÁLISIS DE DATOS

Se efectuó estadística descriptiva con la elaboración de tablas de frecuencias.

ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo fué sometido a aprobación por el comité local de investigación y ética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

El número de aprobación del Fondo para el Fomento de la Investigación Médica (FOFOI) es el FIS/IMSS/PROT/C2007/078

Se solicitó consentimiento informado a ambos padres de los pacientes participantes en el estudio. Se anexa al presente.

FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

El estudio fué factible dado que se contó con el material físico y de laboratorio necesario para la realización del mismo. Se utilizaron las instalaciones del laboratorio de Citogenética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS.

El proyecto fue sometido a evaluación para obtener recursos financieros para reactivos así como para la publicación de los resultados y material de oficina a FOFOI-IMSS.

RECURSOS HUMANOS Y FÍSICOS

Se requirieron muestras de sangre periférica de pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada que satisfagan los criterios de inclusión, mismos que se obtuvieron del servicio de cardiopediatría del HP del CMN SXXI, IMSS, con la colaboración de la Dra. Luisa Gracia Beirana Palencia, médico de base del servicio y de los médicos adscritos a este servicio.

La revisión clínica para descartar que se tratara de la variante sindrómica y, una vez concluido el análisis de citogenética molecular, el asesoramiento genético fue efectuados por los médicos adscritos al servicio de Genética Clínica del HP del CMN SXXI, IMSS así como por la Dra. Lilia Guadalupe Ochoa Lugo.

El procesamiento de muestras, técnicas de citogenética molecular y análisis de los resultados fueron realizadas por la Dra. Lilia Guadalupe Ochoa Lugo.

Todos los procedimientos fueron supervisados por los tutores Dr. Fabio Salamanca Gómez, M. en C. Ana Claudia Velázquez Wong y M. en C. Eunice López Muñoz.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 15 pacientes, siete masculinos (47%) y ocho femeninos (53%). La media de edad al momento del estudio fue de 7 años, el menor de 3 años y el mayor de 10 años.

Las tablas 6 y 7 muestran la distribución de los pacientes de acuerdo a sexo y edad.

Tabla 6. Distribución de los pacientes de acuerdo al sexo

	N	%
Masculino	7	47
Femenino	8	53
Total	15	100

Tabla 7. Distribución de los pacientes de acuerdo a la edad

	N	%
Neonatos	0	0
Lactantes	0	0
Preescolares	5	33
Escolares	9	60
Adolescentes	1	7
Total	15	100

Ninguno de los pacientes presentó malformaciones faciales y/o corporales. Cuatro de ellos mostraron una sola dismorfia facial: punta nasal bulbosa (tres) y hélix plegado (uno).

En ningún paciente se demostró la presencia de delección en 22q11 en el estudio de FISH. No se realizó estudio citogenético convencional.

Las cardiopatías encontradas en nuestros pacientes se muestran en la tabla 8. Se observa un predominio de la tetralogía de Fallot. Sólo en seis pacientes las malformaciones fueron únicas (cinco tetralogías de Fallot, una atresia pulmonar con comunicación interventricular).

En los pacientes con tetralogía de Fallot, dos de ellos además mostraron foramen oval permeable, otro con persistencia de conducto arterioso y origen anómalo de la coronaria derecha a partir de la aorta ascendente, uno con doble lesión pulmonar e insuficiencia pulmonar moderada y otro más con insuficiencia pulmonar y tricuspídea grave.

De los pacientes con transposición de grandes arterias, uno además presentó comunicación interauricular con estenosis valvular pulmonar, el otro comunicación interventricular con estenosis de la arteria pulmonar.

De los pacientes con doble vía de salida de ventrículo derecho, uno presentó un defecto septal atrioventricular y el otro una comunicación interventricular.

Tabla 8. Malformaciones conotruncales de los pacientes.

Malformación	Frecuencia	Porcentaje
Tetralogía de Fallot	10	66.6
Transposición de Grandes Vasos	2	13.3
Doble Vía de Salida del Ventrículo Derecho	2	13.3
Atresia Pulmonar con Comunicación Interventricular	1	6.7
Total	15	100

Con respecto al estado nutricional de los pacientes evaluado por somatometría, el peso para la edad se encontraba por debajo de la percentila 3 en sólo dos niños, ambos con tetralogía de Fallot.

Respecto a los exámenes de gabinete indicados para descartar anomalías asociadas encontradas en los pacientes sindromáticos, a dos pacientes no se les realizó ultrasonido renal debido a defunción de uno de ellos antes de la realización del mismo. El otro paciente es foráneo y no se le realizó el estudio en su hospital general de zona. A cuatro pacientes no se les realizó audiometría o potenciales provocados auditivos por causas diversas (falta de cooperación para el estudio, pérdida de la cita). Los padres de los pacientes refieren audición normal.

Tabla 9. Frecuencia de delección 22q11 en diferentes estudios de niños con malformación conotruncal.

	Ochoa (2008)	Goldmuntz ²³ (1993)	Trost ¹⁵ (1995)	Hou ¹⁹ (1997)	Whortington ²⁰ (1998)	Fokstuen ¹⁸ (1998)	Giray ²⁹ (2003)	Marino ³⁰ (2001)	Gioli-Pereira ³¹ (2008)
No aislada	-	-	14/90 (15.5%)	6/6 (100%)	15/15 (100%)	9/51(17.6%)	4/15(26.6%)	87/95 (91.6%)	-
Aislada	0/15 (0%)	5/17 (29.4%)	-	11/24 (45.8%)	0/75 (0%)	0/59 (0%)	3/21 (14.2%)	1/628 (0.15%)	8/123 (6.5%)
Total	15	17	90	30	90	110	36	723	123

DISCUSIÓN

En este estudio no se pudo demostrar la presencia de delección en 22q11 en nuestros pacientes con malformación conotruncal aislada.

Nuestros hallazgos se aproximan a los informados en los estudios realizados por Fokstuen y Marino, en donde, con la excepción de un paciente en la serie de Marino, la delección en los pacientes con cardiopatía conotruncal aislada es rara (43)(44).

La frecuencia de delección en cardiopatía conotruncal aislada reportada en estudios previos fluctúa entre cero a 35 por ciento en diferentes estudios (45)(46)(43)(47)(48)(49).

La variabilidad interobservador en la exploración física es un aspecto importante al clasificar a un paciente como dismórfico o no (49).

Se han descrito pacientes con delección en 22q11 con presencia de sólo dismorfias faciales leves, como son fisuras palpebrales dirigidas hacia arriba, nariz prominente, base nasal ancha e hipoplasia del alae nasi, difíciles de detectar en los recién nacidos, lo cual podría explicar su clasificación como no dismórficos. Se han reportado en la literatura padres de pacientes con delección en 22q11 y

múltiples anomalías que sólo presentan ya sea dismorfias faciales leves sin alteraciones a otros niveles o anomalías cardiovasculares sin otras alteraciones, con presencia de deleción en 22q11, lo que alerta de la importancia de una evaluación exhaustiva de los padres de estos pacientes, a nivel de exploración física y realización de ecocardiograma (28).

El espectro clínico de los pacientes con deleción en 22q11 es amplio, desde las manifestaciones clásicas multisistémicas, hasta extremadamente leve, por lo cual es importante realizar una exploración física detallada de los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal, para descartar la presencia de dismorfias menores asociadas que indiquen realización de estudios moleculares posteriores (28)(26).

Las cardiopatías más frecuentemente asociadas a deleción en 22q11 son la tetralogía de Fallot y la atresia pulmonar con comunicación interventricular, generalmente asociadas a otras anomalías cardíacas, principalmente anomalías del arco aórtico, de las arterias pulmonares (incluyendo arterias colaterales aortopulmonares principales), del septum infundibular y las valvas semilunares (44)(49)(50).

En nuestro estudio la mayoría de los pacientes presentó tetralogía de Fallot, pero no las anomalías asociadas más frecuentemente vinculadas con la deleción, motivo que podría explicar la ausencia de detección de la misma.

Las cardiopatías conotruncales son la principal causa de mortalidad (más del 90 por ciento de todas las muertes) en los pacientes con deleción en 22q11, observándose la mayoría de ellas en el periodo neonatal (edad media de 7 días) lo que podría explicar la ausencia de detección de deleción en los pacientes de nuestro estudio, ya que no contamos con neonatos en el mismo. (50)(51).

Los pacientes que acuden a la consulta de genética generalmente son de edad mayor a la neonatal y se solicitan muy pocas interconsultas al servicio de genética

por parte del servicio de neonatología. Las interconsultas solicitadas son de pacientes que cursan con un cuadro grave, principalmente tetania por hipocalcemia, esto es, aquellos que se sospechan son sindrómicos. Esto explicaría los pacientes que probablemente presentan delección que no son evaluados por el servicio de genética, ya que fallecen debido a la gravedad de la cardiopatía o las anomalías asociadas en la etapa neonatal.

Los hallazgos de nuestro estudio son importantes debido a que ha sido controversial determinar la frecuencia de delección en cardiopatía conotruncal aislada, siendo investigada por diversos grupos en varios países, no así en México. Es importante destacar la originalidad del estudio en nuestro país.

Se ha intentado con estas investigaciones establecer la necesidad o no de realizar estudios moleculares para la detección de la delección en pacientes con cardiopatía conotruncal aislada, llegándose en la mayoría a la conclusión de que no se deben realizar dichos estudios en estos pacientes. Es necesario buscar intencionadamente dismorfias faciales y otras anomalías extracardiacas. En los pacientes que sí se encuentren anomalías extracardiacas, aún siendo leves, sí se indica la realización de estudios moleculares para descartar la delección (49)(28)(26).

Limitaciones. El pequeño tamaño de la muestra es la principal limitación de este estudio, ya los investigadores que han encontrado delección en pacientes con cardiopatía conotruncal aislada han evaluado por lo menos 30 pacientes, tamaño de la muestra originalmente estimado para este estudio, pero que no se logró alcanzar debido a la falta de pacientes referidos al servicio (20).

La metodología empleada (FISH con sonda TUPLE1) no detecta delecciones menores a 1.5Mb, por lo cual si alguno de los pacientes presentaba delección de menor tamaño no se detectó y se consideró negativo. En estos casos se debe

considerar la realización de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (52)(53).

Recomendaciones. Se sugiere que todos los pacientes con cardiopatía conotruncal congénita sean evaluados por un genetista clínico para descartar la presencia de dismorfias faciales leves y otras anomalías extracardiacas. Esto será de gran utilidad para la detección y tratamiento oportuno de alteraciones encontradas a otros niveles, para mejorar el pronóstico y otorgar un adecuado asesoramiento genético a los padres, ya que en todo paciente con delección en 22q11 se indica la realización de exploración física detallada y ecocardiograma a sus padres. Esto es importante debido al elevado riesgo de recurrencia para futura descendencia que presenta un portador de delección (50 por ciento).

Se recomienda incluir a todos los grupos etarios de pacientes que presenten cardiopatía conotruncal aparentemente aislada al estudio de búsqueda de delección en 22q11 previa exploración física por un genetista clínico. Es necesario incluir a los neonatos y lactantes en el estudio, buscando intencionadamente dismorfias, y de requerirse, solicitar estudio de FISH para búsqueda de delección en 22q11.

CONCLUSIONES

En esta muestra de pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada no se evidenció la presencia de delección 22q11.

Se sugiere realizar exploración física minuciosa por un genetista clínico a todos los pacientes con cardiopatía conotruncal aparentemente aislada para, en caso de presentar dismorfias faciales u otras anomalías extracardiacas indicar la realización de estudio citogenético molecular para detección de delección en 22q11. De encontrar un resultado positivo se indica el estudio familiar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buendia Hernandez, A., et al., [Chromosome 22 (22q.11.2) deletion. Etiology of conotruncal heart abnormalities]. *Archivos del Instituto de Cardiología de Mexico*, 2000. 70(2): p. 148-53.
2. Services, T.D.o.S.H. *Conotruncal Heart Defects 2007* [cited; Available from: <http://www.dshs.state.tx.us/birthdefects/risk/risk15-conotrnc1.shtm>].
3. Behrman RE, K.R., Jenson HB. Nelson, *Tratado de Pediatría*. 17ª ed. ed. 2004: Elsevier. 1499-1548.
4. Kutsche, L.M. and L.H. Van Mierop, *Pulmonary atresia with and without ventricular septal defect: a different etiology and pathogenesis for the atresia in the 2 types? The American journal of cardiology*, 1983. 51(6): p. 932-5.
5. Moore K, Persaud TV, *Embriología clínica*. 7ª edición. 2004: Elsevier.
6. Sadler TW. *Langman Embriología Médica con orientación clínica*. 10ª ed. 2007: Editorial Médica Panamericana.
7. McKusick, V.A. NK2, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, E; NKX2E. 1995 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600584>].
8. McKusick, V.A. T-BOX 5; TBX5. 1997 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601620>].
9. McKusick, V.A. NATRIURETIC PEPTIDE PRECURSOR A; NPPA. 1986 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=108780>].
10. Watkins-Chow, D. NK2, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, C; NKX2C. 2002 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=606727>].
11. Tiller, G.E. NK2, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 6; NKX2-6. 2008 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=611770>].

12. McKusick, V.A. HEART- AND NEURAL CREST DERIVATIVES-EXPRESSED 1; HAND1. 1998 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602406>.
13. McKusick, V.A. HEART- AND NEURAL CREST DERIVATIVES-EXPRESSED 2; HAND2. 1998 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602407>.
14. Smith, M. DIGEORGE SYNDROME CRITICAL REGION GENE 6; DGCR6. 1996 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601279>.
15. Voigt, R., et al., Chromosome 10p13-14 and 22q11 deletion screening in 100 patients with isolated and syndromic conotruncal heart defects. *Journal of medical genetics*, 2002. 39(4): p. e16.
16. Hamosh, A. Tetralogy Of Fallot Syndrome, Autosomal Recessive. 2001 [cited 23/01/2008]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=605618>.
17. McKusick, V.A. Pulmonary Atresia With Ventricular Septal Defect. 1986 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=178370>.
18. McKusick, V.A. Aortic Arch Interruption, Facial Palsy, And Retinal Coloboma. 1986 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=107550>.
19. JJ, Guízar., *Genética clínica. 3a edición ed. 2001: Manual moderno.* 160-161.
20. Hou, J.W., et al., CATCH 22: deletion of locus 22q11 in velocardiofacial syndrome, DiGeorge anomaly, and nonsyndromic conotruncal defects. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 1997. 96(6): p. 419-23.
21. Worthington, S., et al., 22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects. *Journal of paediatrics and child health*, 1998. 34(5): p. 438-43.
22. Fan, Y., *Molecular cytogenetics. 2002: Human press.* 123.

23. Gorlin RJ, C.M., Hennekam RCM, *Syndromes of the head and neck*. 4ed ed. 2001: Oxford. 820-822.
24. Pavlov, A.R., et al., *Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications*. *Trends Biotechnol*, 2004. 22(5): p. 253-60
25. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology (N Y)*, 1993. 11(9): p. 1026-30.
26. Pereira, A.C., et al., *High specificity PCR screening for 22q11.2 microdeletion in three different ethnic groups*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* . [et al, 2003. 36(10): p. 1359-65.
27. McKusick, V.A. VELOCARDIOFACIAL SYNDROME. 1986 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=192430>.
28. Digilio, M.C., et al., *Spectrum of clinical variability in familial deletion 22q11.2: from full manifestation to extremely mild clinical anomalies*. *Clinical genetics*, 2003. 63(4): p. 308-13.
29. Cassidy S, A.J., *Management of genetic syndromes*. 2nd ed. 2005: New Jersey. 615-631.
30. KL, J., *Recognizable patterns of human malformation*. 6ed ed. 2006: Elsevier. 298-301.
31. McKusick, V.A. T-BOX 1; TBX1. 1997 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602054>.
32. McKusick, V.A. HISTONE CELL CYCLE REGULATION DEFECTIVE, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, A; HIRA. 1994 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600237>.
33. McKusick, V.A. DIGEORGE SYNDROME CRITICAL REGION GENE 2; DGCR2. 1999 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600594>.

34. Sherman, P.M. ARMADILLO REPEAT GENE DELETED IN VCFS; ARVCF. 1998 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602269>.
35. McKusick, V.A. SOLUTE CARRIER FAMILY 25 (MITOCHONDRIAL CARRIER, CITRATE TRANSPORTER), MEMBER 1; SLC25A1. 1993 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=190315>.
36. Nocente, C. MITOCHONDRIAL RIBOSOMAL PROTEIN L40; MRPL40. 2000 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=605089>.
37. McKusick, V.A. DISHEVELLED 1-LIKE 1; DVL1L1. 1996 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601225>.
38. McKusick, V.A. CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE; COMT. 1987 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=116790>.
39. Hartz, P.A. DIGEORGE SYNDROME CRITICAL REGION GENE 8; DGCR8. 2004 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=609030>.
40. McKusick, V.A. GATA-BINDING PROTEIN 4; GATA4. 1995 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600576>.
41. McKusick, V.A. DIGEORGE SYNDROME CRITICAL REGION GENE 14; DGCR14. 1997 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601755>.
42. Morrow B., Microdeletions and microduplications: mechanism. *Encyclopedia of life sciences*, 2005. 10 (1): p. 1-5
43. Fokstuen, S., et al., 22q11.2 deletions in a series of patients with non-selective congenital heart defects: incidence, type of defects and parental origin. *Clinical genetics*, 1998. 53(1): p. 63-9.
44. Marino, B., et al., Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genetics in medicine*, 2001. 3(1): p. 45-8.

45. Khositseth, A., et al., Chromosome 22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects. *Pediatric cardiology*, 2005. 26(5): p. 570-3.
46. Maeda, J., et al., Frequent association of 22q11.2 deletion with tetralogy of Fallot. *American journal of medical genetics*, 2000. 92(4): p. 269-72.
47. Goldmuntz, E., et al., Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects. *Journal of medical genetics*, 1993. 30(10): p. 807-12.
48. Jiang, L., et al., Association of 22q11 deletion with isolated congenital heart disease in three Chinese ethnic groups. *International journal of cardiology*, 2005. 105(2): p. 216-23.
49. Gioli-Pereira, L., et al., Frequency of 22q11.2 microdeletion in sporadic non-syndromic tetralogy of Fallot cases. *International journal of cardiology*, 2008. 126(3): p. 374-8.
50. Kyburz, A., et al., The fate of children with microdeletion 22q11.2 syndrome and congenital heart defect: clinical course and cardiac outcome. *Pediatric cardiology*, 2008. 29(1): p. 76-83.
51. Donna M McDonald-McGinn, M., CGC. 22q11.2 Deletion Syndrome. 1999 [cited; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=gr_22q11deletion].
52. Higuchi, R., et al., Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 1993. 11(9): p. 1026-30.
53. McKusick, V.A. DIGEORGE SYNDROME; DGS. 1986 [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=188400>].



ANEXO 1
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN TITULADO: “Frecuencia de microdeleciones de
22q11 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada
del HP del CMN SXXI, IMSS”.

Este estudio involucra a niños con alteraciones en la forma (malformaciones) de su corazón que se presentan desde el nacimiento (congénitas). Estas alteraciones en la forma del corazón son detectadas por los médicos cardiólogos en 1 de cada 100 niños recién nacidos vivos. Los defectos en los que los tabiques del corazón están alterados (conotruncales) representan del 50-60% de todas las malformaciones cardíacas congénitas, y se sabe que la alteración de la información del material de la herencia (genes) influye en su desarrollo. Cuando las malformaciones cardíacas conotruncales no se acompañan de otras alteraciones en su cuerpo se llaman aisladas. A su hijo (a) se le ha invitado a participar en un estudio de investigación ya que se le ha diagnosticado malformación cardíaca congénita conotruncal aislada.

Se han realizado estudios de investigación en diversos países para tratar de identificar la causa. En algunos pacientes se ha encontrado pérdida de material de la herencia (deleción), por lo cual es importante realizar este tipo de estudio en nuestro país, para conocer la frecuencia de la deleción y explicar a los padres acerca de si se trata de una alteración heredada o no.

Por este conducto se le solicita su consentimiento informado para realizar la búsqueda de la pérdida de material de la herencia en las células de la sangre de su hijo.

2. Procedimiento.

Se tomarán 2 ml de sangre del brazo del paciente siempre y cuando reúna las características establecidas previamente y sólo si desean participar de manera libre en este protocolo de investigación. Al término del estudio el investigador proporcionará la información completa sobre los resultados.

3. Beneficios y riesgos.

Beneficios:

El estudio de búsqueda de la pérdida de material de la herencia en células de la sangre de su hijo (a), proporcionará información útil para conocer la frecuencia de deleciones en pacientes con malformación cardíaca congénita conotruncal aislada y nos orientará hacia la necesidad de realizar este tipo de estudios en todos los pacientes con éste diagnóstico, además de que permitirá explicar a los padres si hay riesgo o no de tener hijos con la misma alteración o alteraciones similares en embarazos futuros de los padres del paciente y del propio paciente.

Riesgos:

El riesgo al tomar la muestra de sangre es que el paciente puede presentar dolor y en ocasiones coloración morada (equimosis) en la zona de la punción, la cual desaparece en 2-3 días.

4. Confidencialidad.

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin su consentimiento por escrito.

5. Participación/suspensión.

La participación de usted y de su hijo en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Su decisión de retirarse o suspender el estudio no afectará la calidad ni la disponibilidad de atención médica para su hijo.

6. Consentimiento.

La Dra. Lilia Guadalupe Ochoa Lugo, residente de segundo año de la especialidad en Genética Médica se ha encargado de explicarle los pormenores del estudio así como los beneficios y riesgos potenciales que este implica. Usted ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si usted tiene alguna duda deberá comunicarse con los responsables del estudio.

Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombre del paciente

Nombre del padre o tutor

Firma del padre o tutor

Nombre de la madre o tutor

Firma de la madre o tutor

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

Ante cualquier duda pedir información con Dra. Lilia Guadalupe Ochoa Lugo, Dr. Fabio Salamanca Gómez, M. en C. Ana Claudia Velázquez Wong ó M. en C. Eunice López Muñoz, responsables del estudio, ubicados en el segundo piso en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS o en el teléfono 56 27 69 41.

ANEXO 2. TÉCNICAS CROMOSÓMICAS Y DE CITOGÉNÉTICA MOLECULAR

Las muestras de sangre periférica fueron analizadas mediante el método de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), utilizando sondas específicas para la región 22q11.2 (TUPLE1) y para la región 22qter (Cytocell, Technologies Ltd., UK.). La sonda 22q11.2 se extiende aproximadamente 120 Kb y abarca completamente al gen TUPLE1. Esta sonda se utiliza para identificar deleciones en enfermedades como el síndrome de DiGeorge, Velocardiofacial (VCFS) y anomalías conotruncales. La sonda 22qter permite una identificación efectiva del cromosoma 22 y actúa como sonda control. La sonda 22q11.2 está marcada directamente con el fluorocromo Rojo Texas y la 22qter con FITC.

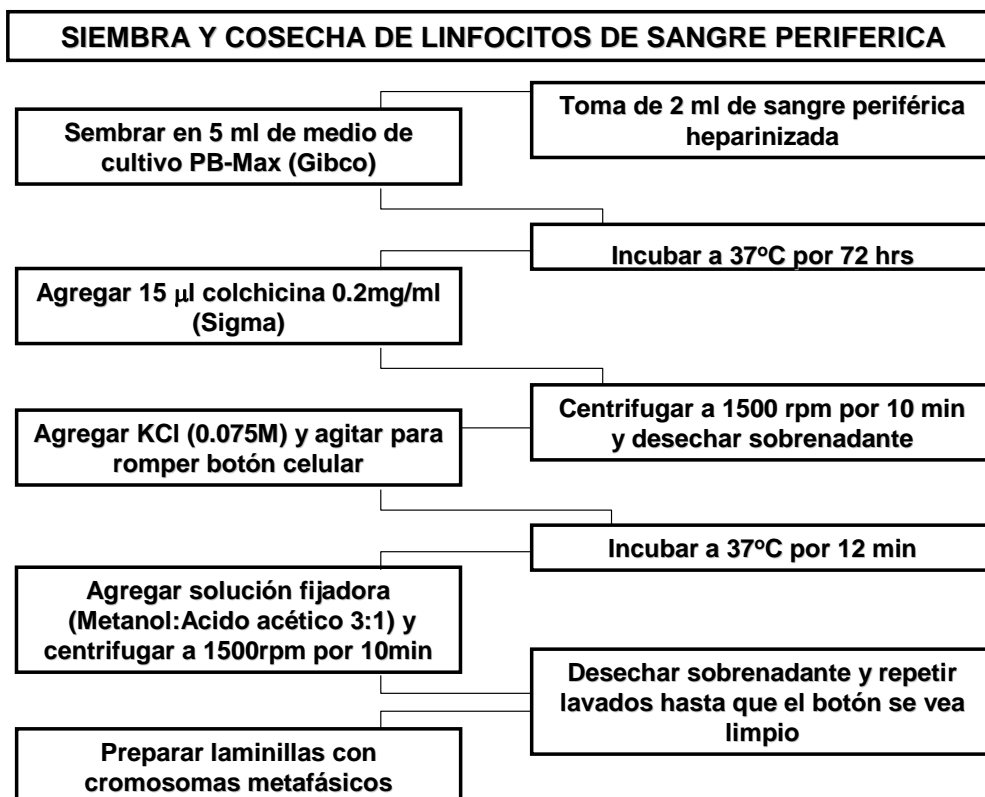
Se realizó la metodología de técnicas de citogenética convencional para la obtención de cromosomas metafásicos, y la técnica de FISH se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del producto. A cada paciente se le tomó una muestra de sangre periférica con una jeringa heparinizada, y se procedió a realizar la siembra y cosecha de linfocitos. En frascos de cultivo Falcon que con contenido de 5 ml de medio de cultivo PB-Max (Gibco) se agregaron 2 ml de sangre periférica y se incubaron a 37°C por 72 horas. Posteriormente se agregaron 15 μ l de colchicina (0.2mg/ml) (Sigma) y se incubaron por 30 minutos. La muestra fue centrifugada y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 8 ml de solución hipotónica 0.075M (KCl) y se incubó a 37°C por 12 minutos. Al final de la incubación se agregaron 8 ml de solución fijadora Carnoy (Metanol: Ácido Acético 3:1). Se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm y se repitió este paso tres veces o hasta que el botón celular se veía limpio.

El botón celular se resuspendió en 1 ml de solución fijadora Carnoy, y con esa suspensión que contenía cromosomas metafásicos, se prepararon laminillas dejando caer de 3 a 5 gotas en cada portaobjetos previamente lavado y desengrasado. Las laminillas se dejaron secar y madurar al aire durante 24 horas antes de proceder a la técnica de FISH.

Para la prueba de FISH, cada laminilla se lavó por 2 minutos en solución salina 2XSSC y después se sometió a una deshidratación en una serie de etanol (70%, 85% y 100%) durante dos minutos en cada uno. Se dejó secar al aire y

posteriormente se le agregaron 10 μ l de la mezcla de sondas que contenía tanto a la región específica para 22q11.2 (TUPLE1) y para 22qter. Posteriormente se colocó un cubreobjetos de 22x22 mm y se selló perfectamente la preparación con resina. La preparación se colocó en una placa de calentamiento a 72°C para llevar a cabo la desnaturalización simultánea de la muestra y la sonda durante dos minutos. Se incubó a 37°C por toda la noche para permitir la hibridación. Al día siguiente se realizaron los lavados post-hibridación con solución salina (2XSSC). Finalmente se agregaron 10 μ l de DAPI-antifade y se observó en un microscopio de fluorescencia AxioImager A1 de Carl Zeiss equipado con un filtro de triple banda para permitir la detección simultánea de señales verdes y rojas. Al menos 30 metafases cromosómicas se analizaron para cada paciente. Las imágenes que se observaron fueron capturadas con el software específico Isis Metasystems de Carl-Zeiss. Los pacientes que presentaran la delección mostrarían solamente una señal roja y dos señales verdes, mientras que los pacientes que no presentaran la delección tendrían dos señales rojas y dos verdes, una en cada cromosoma homólogo.

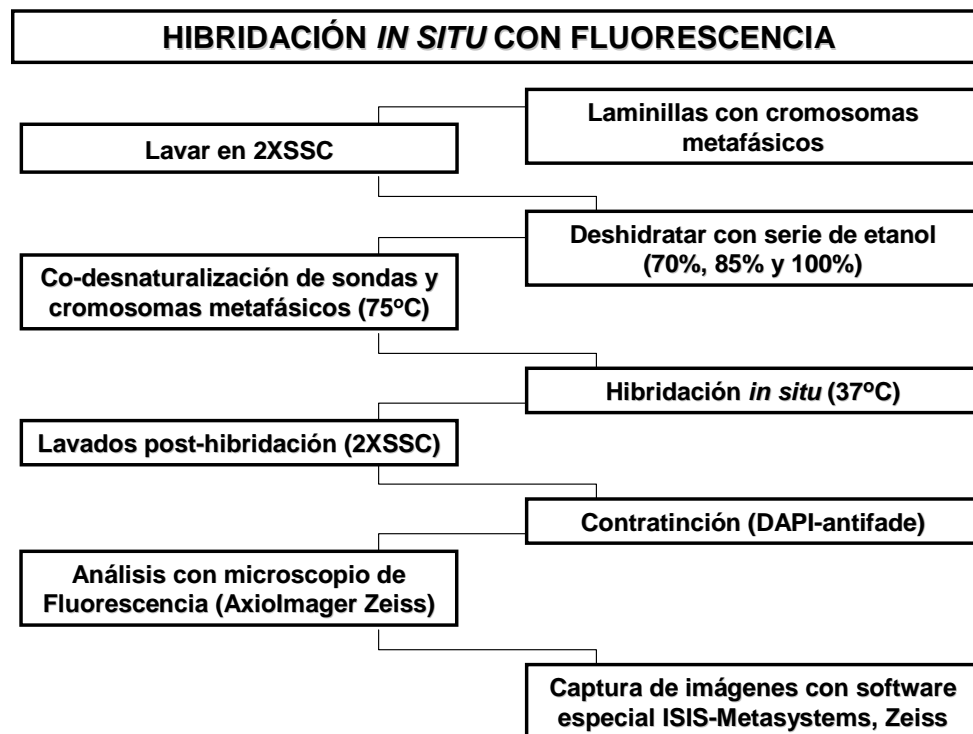
Figura 2. Diagrama de flujo de la preparación de la muestra sanguínea.



Se toma una muestra de sangre periférica por venopunción con jeringa heparinizada. Se siembra la sangre en un medio de cultivo, el cual se incuba a 37° C durante 72 horas. Al cumplir los 3 días se cosecha el cultivo, se agrega colchicina para detener a los cromosomas en la metafase de la mitosis. Se centrifuga durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Se agrega KCl y se agita para romper el botón celular. Se incuba a 37° C durante 12 minutos. Posteriormente se agrega solución fijadora y se centrifuga de nuevo por 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se lava repetidamente hasta que el botón se vea limpio. Finalmente se preparan las laminillas con los cromosomas metafásicos.

En el siguiente diagrama de flujo se esquematizan los pasos necesarios para la hibridación in situ.

Figura 3. Diagrama de flujo de la hibridación in situ con fluorescencia.



Las laminillas con los cromosomas metafásicos se lavan con solución salina. Se deshidratan las laminillas con etanol a diferentes concentraciones (dos minutos en cada concentración 70, 85 y 100%). Se agrega la sonda a las laminillas y simultáneamente se desnaturalizan la sonda y los cromosomas metafásicos a 75° C. La hibridación *in situ* se realiza colocando las laminillas a 37° C durante 16 horas, posterior a lo cual se lavan las laminillas con solución salina. Se realiza la contratinción de los cromosomas agregando DAPI-antifade para preservar la fluorescencia. Se analizan las laminillas al microscopio de fluorescencia y se capturan las imágenes con un software especial.