



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Análisis molecular de *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* en pacientes con datos fenotípicos del espectro de la delección 22q11.2 y en pacientes con cardiopatía troncoconal aislada

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
MARIANA ALCIONE RIVES GÜENDULAIN

Director de Tesis:
Dr. David Cruz Robles
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Octubre de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica
del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

El presente trabajo se realizó con el apoyo financiero del proyecto:

“Estudio Molecular de la Región 22q11.2 en pacientes mexicanos con Síndrome
DiGeorge/Velocardiofacial”

CONACYT CB-2011-01 No.de reg. 169478

Colaboración con.

Dr. Roberto Guevara Yáñez. Laboratorio BIOGEN

Dr. Diego Julio Arenas Aranda. HP CMN S.XXI†

Dra. Ana Claudia Velázquez Wong. HP CMN S.XXI

Dr. Alfonso Buendía Hernández. INCICH

Dra. Rocío Sánchez Urbina. HIMFG

Dra. Norma Alicia Balderrabano Saucedo. HIMFG

A mi familia

CONTENIDO

1. RESUMEN	11
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Fenotipo	13
2.1.1 Dismorfias faciales.....	13
2.1.2 Anomalías cardiovasculares.....	14
2.1.3 Anomalías endocrinológicas.....	15
2.1.4 Anomalías inmunológicas.....	15
2.1.5 Anomalías oftalmológicas.....	16
2.1.6 Alteraciones mentales y en el aprendizaje	16
2.1.7 Alteraciones otorrinolaringológicas.....	18
2.1.8 Anomalías renales.....	18
2.2 Embriología	19
2.3 Mecanismo de la deleción.....	21
2.4 Diagnóstico	24
2.5 Manejo Clínico	26
2.6 Riesgo de recurrencia.....	27
3 ANTECEDENTES	29
3.1 Genes implicados	30
3.1.1 Gen <i>TBX1</i> (T-BOX 1).....	30
3.1.2 Gen <i>HIRA/TUPLE 1</i> (Histone Cell Cycle Regulator)	33
3.1.3 Gen <i>CRKL</i> (V-CRK Avian Sarcoma Virus CT 10 Oncogene Homolog Like, CRK-Like proto-oncogene, adaptator protein)	34
3.2 Análisis molecular	36
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
5 JUSTIFICACIÓN	38
6 OBJETIVOS	39
6.1 Objetivo principal:.....	39
6.2 Objetivos secundarios.....	39
7 MATERIAL Y MÉTODOS	39

8	ANÁLISIS	41
9	CONSIDERACIONES ÉTICAS	42
10	RESULTADOS	44
10.1	Frecuencia de sexo y Antecedentes familiares.....	46
10.2	Frecuencia de Cardiopatías Congénitas.....	46
10.3	Manifestaciones clínicas	48
10.4	Estudios moleculares.....	49
11	DISCUSIÓN	62
12	CONCLUSIONES	67
13	PERSPECTIVAS	68
14	BIBLIOGRAFÍA	69
15	ANEXOS	78

ABREVIATURAS

AI Aorta interrumpida	GP Glucoproteína
AP Atresia pulmonar	GTG Giemsa Tripsina Giemsa
AR Ácido retinoico	HP Hospital de Pediatría
ASDA Arteria Subclavia derecha aberrante	HRM Análisis de alta resolución de fusión (High Resolution Melting)
AT Atresia triscuspídea	HVI Hipertrofia del ventrículo izquierdo
AVP Ausencia de la válvula pulmonar	H3 Histona 3
BCR-ABL cromosoma Philadelphia	IAA-B Interrupción del arco aórtico tipo B
CAFS Síndrome de anomalías faciales conotruncales	IgA Inmunoglobulina A
CAP Colaterales aortopulmonares	IgG Inmunoglobulina G
CAVP Conexión anómala de vasos pulmonares	IgM Inmunoglobulina M
CC Cardiopatía congénita	Ig's Inmunoglobulina
CCN Células de la cresta neural	INCICH Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"
CGH Hibridación genómica comparada	kb kilobases
CIA Comunicación interauricular	KCl Cloruro de potasio
CIV Comunicación interventricular	LCR Repetidos de bajo número de copias (Low Copy Repeats)
CNV Variante en el número de copias	Mb Megabases
CMV Citomegalovirus	MEC Matriz extracelular
COMT Catecol O-metiltransferasa	MgCl₂ Cloruro de Magnesio
CRKL V-CRK Avian Sarcoma Virus CT 10 Oncogene Homolog-Like	MLPA Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligamiento (Multiplex ligation dependent probe amplification)
DAA Doble arco aórtico	MLV Músculo liso vascular
DAPI 4,6-diamidino-2-fenilindol	mM Milimolar
Del22q11.2 Deleción 22q11.2	MPM Marcador de peso molecular
DGS Síndrome DiGeorge	ng nanogramo
DMSO Dimetilsulfóxido	NHEJ Unión final no homóloga (Non homologous end joining)
DNA Ácido desoxirribonucleico	N25 Sonda N25 (63 kb)
dNTP's dideoxinucleótidos	OMIM Online Mendelian Inheritance
DVSVD Doble vía de salida del ventrículo derecho	pb pares de bases
DXM Dextromorfismo	PCA Persistencia del conducto arterioso
EDTA Ácido etilendiamino-tetraacético	PCR Reacción en cadena de la polimerasa
EP Estenosis pulmonar	PEATC Potenciales evocados auditivos del tallo cerebral
etOH Etanol	PEV Potenciales evocados visuales
FGF-8 Factor de crecimiento de fibroblastos 8	Primer F Cebador inicial
FGF-10 Factor de crecimiento de fibroblastos 10	Primer R Cebador reverso
FISH Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	
FVW Factor Von Willebrand	
GC Guanina/Citosina	

RBC Células rojas sanguíneas (red blood cells)
RCC Ramas confluentes colaterales
RHNA Recombinación homóloga no alélica
RTD Región típica de deleción
RTK's Receptores de Tirocin cinasa
SCC Campo cardiaco secundario
SD- Paciente con Síndrome Deleción 22q11.2
SDel22q11.2 Síndrome de Deleción 22q11.2
seg segundos
SHH Sonic Hedgehog
snRNA Ácido ribonucleico pequeño nuclear
SSC Solución Salina Sodio Citrato
TA Tronco arterioso
TaqPol TaqPolimerasa

TBX-1 T-BOX1
TC Tronco común
TM Temperatura de alineación
TF Tetralogía de Fallot
TGV Trasposición de grandes vasos
TREC Circuitos de escisión de receptores de células T
UMAE Unidad Médica de Alta Especialidad
USG Ultrasonido
UV Ultravioleta
VCFS Síndrome velocardiofacial
VHN Voz hipernasal
VNTR Repetidos en tándem de número variable (Variable number tandem repeats)
VPP Valor predictivo positivo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Embriología de los arcos faríngeos.....	19
Figura 2. Desarrollo de la región cardiovascular.....	20
Figura 3. Región 22q11.2 Genes y Low Copy Repeats (LCR) A-D RTD.....	21
Figura 4. RTD y Deleciones atípicas.....	23
Figura 5. FISH en SDe122q11.2.....	25
Figura 6. Estructura del gen <i>TBX1</i>	30
Figura 7. Estructura del gen <i>HIRA/TUPLE1</i>	33
Figura 8. Estructura del gen <i>CRKL</i>	34
Figura 9. Resultados entre pacientes con Cardiopatía troncoconal aislada y en pacientes sindrómicos	45
Figura 10. MLPA con deleción en región 22q11.2 en paciente SD14-119.....	51
Figura 11. MLPA con deleción en región 22q11.2 en paciente SD13-68.....	51
Figura 12. MLPA con deleción en región 22q11.2 en paciente SD13-50.....	53
Figura 13. MLPA con cambios inespecíficos en región 22q11.2 en paciente SD13-53.....	53
Figura 14. MLPA con cambios en región 22q11.2 en paciente SD14-94.....	55
Figura 15. MLPA con cambios en región 22q11.2 en paciente SD14-107.....	55
Figura 16. Software Coffalyser MLPA.....	86
Figura 17. Software de Applied Biosystems HRM en la estandarización de diferentes exones del gen <i>HIRA</i>	89
Figura 18. Estandarización de PRC para el exón <i>CRKL1D</i> (225 pb) por gradiente de temperatura.....	97
Figura 19. Amplificación de diferentes exones de los genes <i>CRKL</i> , <i>HIRA</i> y <i>TBX1</i>	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Otras cardiopatías asociadas con SDe122q11.2.....	14
Tabla 2. Resumen de resultados de estudios de FISH, MLPA y HRM en pacientes con datos fenotípicos del espectro de la deleción 22q11.2 y en pacientes con cardiopatía troncoconal aislada.....	44
Tabla 3. Frecuencia de sexo y antecedentes heredofamiliares.....	46
Tabla 4. Frecuencia de manifestaciones clínicas en pacientes con del22q11.2.....	48
Tabla 5. MLPA y Cariotipo en pacientes con FISH positivo a la Deleción 22q11.2.....	50
Tabla 6. MLPA y Cariotipo en pacientes con FISH negativo a la Deleción 22q11.2.....	52
Tabla 7. MLPA y Cariotipo en pacientes con FISH negativo a la Deleción 22q11.2.....	54
Tabla 8. Variantes del gen <i>HIRA</i> mediante High Resolution Melting en pacientes con cardiopatía troncoconal negativos a del22q11.2.....	56
Tabla 9. Variantes del gen <i>CRKL</i> mediante High Resolution Melting en pacientes con cardiopatía troncoconal negativos a del22q11.2.....	58
Tabla 10. Variantes del gen <i>TBX1</i> mediante High Resolution Melting en pacientes con cardiopatía troncoconal negativos a del22q11.2.....	59
Tabla 11. Relación genotipo-fenotipo en pacientes positivos a del22q11.....	60
Tabla 12. Componentes para reacción HRM.....	87
Tabla 13. Condiciones HRM.....	88
Tabla14. Variaciones de Tm para los diferentes exones.....	88

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Frecuencia de cardiopatías congénitas en pacientes positivos y negativos a la Deleción 22q11.2.....	47
---	----

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo del trabajo experimental.....	78
Anexo 2. Cultivo de Linfocitos de sangre periférica.....	79
Anexo 3. Técnica de Bandas GTG para Cariotipo.....	81
Anexo 4. FISH (Hibridación fluorescente <i>in situ</i>).....	82
Anexo 5. Extracción de DNA (Kit Puregene, Qiagen).....	83
Anexo 6. MLPA (Amplificación múltiple dependiente de ligación).....	85
Anexo 7. HRM (High Resolution Melting).....	87
Anexo 8. Diseño de Primers.....	90
8.1 Diseño de Primers para gen <i>CRKL</i>	91
8.2 Diseño de Primers para gen <i>HIRA</i>	92
8.3 Diseño de Primers para gen <i>TBX1</i>	93
Anexo 9. Condiciones de Estandarización de PCR.....	94

1. RESUMEN

Las cardiopatías congénitas tienen una prevalencia a nivel mundial de 2.1 a 12.3 por 1000 recién nacidos vivos

y constituyen las malformaciones congénitas más frecuentes; muchas de ellas se desarrollan en el contexto de un síndrome malformativo debido a cromosomopatías, enfermedades monogénicas y teratógenos. Dentro de los síndromes más frecuentes se encuentra el SDel22q11.2 que se caracteriza por alteraciones craneofaciales, cardiopatía troncoconal, hipocalcemia, paladar hendido (submucoso), insuficiencia velofaríngea, voz hipernasal, problemas de aprendizaje, inmunodeficiencia o aplasia tímica y trastornos psiquiátricos. Generalmente en estos pacientes se encuentra una deleción de 3 megabases en la región 22q11.2 diagnosticada mediante Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH). Hasta el momento existe controversia si se deben realizar pruebas moleculares en los pacientes que presentan cardiopatía troncoconal aislada en búsqueda de la deleción 22q11.2, así como realizar pruebas más detalladas en los casos que presentan el fenotipo clásico del SDel22q11.2 pero que se ha descartado la deleción mediante FISH.

Con el fin de encontrar deleciones típicas en la región 22q11.2 en pacientes con cardiopatía troncoconal, deleciones atípicas en pacientes con fenotipo clásico de SDel22q11.2 con FISH normal y lograr establecer una relación genotipo-fenotipo se realizó FISH, MLPA y HRM de los genes de la región crítica de 22q11.2 involucrados en la cardiogénesis *TBX1*, *HIRA* y *CRKL*. Para ello se estudiaron 96 pacientes con cardiopatías troncoconales, de los cuales 32 fueron positivos a la deleción mediante FISH, la cual se corroboró mediante MLPA en el 96%. En 1 caso de FISH negativo se encontró deleción atípica por MLPA. Por otro lado, se detectó que la cardiopatía más frecuente en el SDel22q11.2 fue la Tetralogía de Fallot (46%) seguida de Tronco arterioso (9%) y Atresia/Estenosis pulmonar (6%). El mayor número de variantes mediante HRM se observó en los exones 6,11,16, 17 y 26 del gen *HIRA*, en el exón 3 de *CRKL* (3B, 3CD, 3J, 3N Y 3P) y en los exones 1,5, 7/8 y 9A de *TBX1*; especialmente en pacientes con las CC más complejas como TF, TGV, TA2, AP asociada a otras alteraciones, CIA/CIV y DVSVD; de igual manera

todos los casos de paladar hendido de pacientes con SDe122q11.2 en este estudio presentan variantes en el exón 3 de *CRKL*, por lo que dichas variantes tendrán que ser comprobadas mediante secuenciación

En vista de lo anterior, dada la expresividad variable del SDe122q11.2 resulta de gran importancia realizar pruebas moleculares a todos los pacientes con cardiopatía troncoconal, para poder ofrecer un adecuado asesoramiento genético, así como proveer tratamientos oportunos de las diferentes manifestaciones del padecimiento. Además, las técnicas moleculares de mayor resolución a menor costo como el MLPA o el HRM pueden ser útiles en la construcción de una base de datos común que permita establecer una adecuada relación genotipo-fenotipo para unificar criterios clínicos y moleculares en el diagnóstico de SDe122q11.2, así como esclarecer la función de ciertos genes en la cardiogénesis y en el desarrollo de las malformaciones cardíacas.

2. MARCO TEÓRICO

El síndrome de DiGeorge (DGS, OMIM# 188400), inicialmente descrito por Angelo Mario DiGeorge en 1965⁽¹⁾ y el Síndrome Velocardiofacial (VCFS, OMIM #192430), son los síndromes de microdelección cromosómica más frecuente en humanos, con una incidencia variable de 1 en 2000 a 4000 recién nacidos vivos⁽²⁾. Durante muchos años se consideró que dichos síndromes, así como el síndrome de anomalías faciales y troncoconales (CAFS o Síndrome de Takao)⁽³⁾ eran síndromes distintos; sin embargo, comparten la misma etiología, es decir, la delección de la región q11.2 del cromosoma 22, por lo que todos estos síndromes se clasifican como variaciones de un mismo espectro clínico, denominado síndrome de la delección 22q11.2 (SDel22q11.2) con expresividad variable y superposición del fenotipo⁽⁴⁾.

2.1 Fenotipo

Las características clínicas del SDel22q11.2 muestran una amplia variabilidad y se han descrito más de 180 de ellas, aunque no se presentan todas juntas en el 100% de los casos⁽⁵⁾; sin embargo, las más frecuentes incluyen dismorfias craneofaciales, alteraciones palatinas, voz hipernasal, aplasia o hipoplasia del timo y de glándulas paratiroides, acompañadas de defectos cardíacos típicamente troncoconales, inmunodeficiencia, hipocalcemia, así como retraso en el desarrollo, déficit cognitivo, trastornos neuropsiquiátricos, defectos oculares, malformaciones de las extremidades superiores, atrofia cerebelar, defectos traqueales, sordera, alteraciones gastrointestinales, malformaciones urológicas y renales principalmente⁽⁶⁾.

2.1.1 Dismorfias faciales

Los pacientes presentan un fenotipo que por lo regular se va acentuando con la edad y consiste en cara alargada con filtrum corto, boca pequeña con las comisuras de los labios dirigidas hacia abajo, úvula bífida, paladar alto arqueado, micrognatia, raíz nasal prominente y cuadrada, punta de la nariz bulbosa, narinas estrechas, fisuras palpebrales estrechas, hipertelorismo, pabellones auriculares

pequeños de baja implantación o con plegamiento del hélix y facies asimétrica con el llanto, o al sonreír, por hipoplasia del músculo depresor del labio inferior, hipoplasia del esmalte dental, hipondocia o adoncia, así como paladar hendido y/o paladar hendido submucoso⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

2.1.2 Anomalías cardiovasculares

Las anomalías cardiovasculares están presentes en el 80% de los pacientes con del22q11.2, por lo regular se manifiestan en el periodo prenatal o neonatal y constituyen la manifestación inicial que conduce al diagnóstico⁽⁹⁾. Las malformaciones más frecuentes son las anomalías troncoconales, que incluyen a la Tetralogía de Fallot (TF) y TF con atresia pulmonar (10 a 21%), comunicación interventricular (CIV) (13 a 18%), interrupción del arco aórtico tipo B (61 %) y tronco arterioso (20 a 41%) ⁽¹⁰⁾. También se han descrito otras cardiopatías asociadas (5%)⁽¹¹⁾ como se muestra en la Tabla 1⁽¹²⁾. Pueden presentarse además anomalías vasculares en cabeza y cuello, principalmente desplazamiento medial de las arterias carótidas.

Tabla 1. Otras cardiopatías asociadas con SDe122q11.2 ⁽¹²⁾	
Arco aórtico	Arteria subclavia aberrante, arteria innominada aberrante, persistencia del conducto arterioso, ausencia del conducto arterioso, coartación de la aorta, colaterales aortopulmonares mayores, doble arco aórtico, conducto arterioso bilateral, arco aórtico cervical, arteria carótida común aberrante, anillo vascular.
Región troncoconal	Doble salida del ventrículo derecho, trasposición de los grandes vasos, válvula pulmonar ausente, atresia pulmonar aislada, estenosis aórtica, hipoplasia valvular aórtica, estenosis valvular pulmonar
Otras alteraciones	Atresia tricúspidea, retorno venoso anómalo parcial, isomerismo atrial, dextrocardia, hipoplasia del corazón izquierdo.

2.1.3 Anomalías endocrinológicas

Las endocrinopatías más comunes en este síndrome son el hipoparatiroidismo, hipotiroidismo, hipertiroidismo y deficiencia de hormona del crecimiento. Entre estas, el hipoparatiroidismo fue el primer trastorno hormonal reconocido en el SDel22q11.2 documentado por la aplasia o hipoplasia de las glándulas paratiroides en cirugía o autopsia; tiene como consecuencia la hipocalcemia entre 60-80% de los pacientes⁽¹³⁾, y se manifiesta con crisis convulsivas, temblores, estridor, dificultad en la alimentación, temblor y tetania; la hipocalcemia puede presentarse en el periodo neonatal de forma transitoria, debido a la baja reserva de hormona paratiroidea y un cese abrupto del calcio materno postparto, por lo general mejora durante el primer año de vida conforme las glándulas paratiroides se hipertrofian. Sin embargo, la recurrencia puede ser precipitada por un incremento en la demanda metabólica, como la adolescencia y el embarazo o por enfermedad aguda en edad adulta⁽¹⁴⁾.

En cuanto al hipotiroidismo, éste puede ser subclínico o moderado y por ende, descubierto tardíamente, aunque existen casos de presentación neonatal, así como de tiroiditis y Diabetes Mellitus tipo 1 por autoinmunidad⁽¹⁵⁾.

2.1.4 Anomalías inmunológicas

Las alteraciones inmunes resultan de un desarrollo tímico deficiente. La aplasia tímica es la alteración más severa, aunque se presenta en < 1% de los casos (SDel22q11.2); mientras que la hipoplasia tímica se observa en 80-95% de los pacientes.

A nivel celular, la disfunción de Linfocitos T (CD3⁺ o CD4⁺), ya sea en número (60%) o en función (20%), es la característica más frecuente; sobre todo durante el período neonatal y en el primer año de vida. Una característica adicional es la presencia de un número bajo de círculos de escisión de Receptores de Células T (TREC's)⁽¹⁶⁾ y una proporción expandida de células B (CD19⁺) y natural killers (CD16⁺CD56⁺) en pacientes comparados con controles. A nivel humoral puede

afectarse la producción de anticuerpos (15%) como deficiencia de IgA, IgG e IgM y pobre respuesta a las vacunas⁽¹⁷⁾. Hasta el 10% de los pacientes presentan enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide juvenil, purpura trombocitopénica idiopática, anemia aplásica/hemolítica y tiroiditis⁽¹⁸⁾.

Las alteraciones inmunológicas en el SDe122q11.2 clínicamente se evidencian en mayor susceptibilidad a infecciones recurrentes, tanto de vías respiratorias como gastrointestinales; rash generalizado, linfadenopatía o hepatoesplenomegalia. En los casos de aplasia tímica se hace necesario el tratamiento con antibióticos profilácticos y trasplante tímico o incluso de médula ósea, así como de inmunoterapia; mientras en los otros casos se puede recurrir al aislamiento o al uso de productos sanguíneos irradiados⁽¹⁹⁾.

2.1.5 Anomalías oftalmológicas

Un tercio de los pacientes presentan vasos retinianos tortuosos, embriotoxón posterior, fisuras palpebrales estrechas y discos ópticos pequeños. Hasta en el 59% de los pacientes pueden encontrarse alteraciones de la refracción como hipermetropía y astigmatismo, los cuales no ponen en peligro la visión. En casos aislados es posible detectar nódulos en el iris, nervios corneales prominentes, cataratas y estrabismo; existen también casos reportados de coloboma de iris y coriorretinal⁽²⁰⁾.

2.1.6 Alteraciones mentales y en el aprendizaje

El fenotipo conductivo en SDe122q11.2 incluye retraso mental leve a moderado con coeficiente intelectual de 70 y un incremento en enfermedades mentales mayores o alto riesgo de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia. En cuanto a las habilidades cognitivas no todas se encuentran afectadas en la misma manera y la mayoría de los pacientes se adaptan y comprenden bien las reglas sociales. Las habilidades visuoperceptuales y la planeación tienden a ser las más afectadas, mientras que en otros pacientes la dificultad para el aprendizaje puede ser la única manifestación del SDe122q11.2. A pesar de que hay algunas mejorías

con la edad, las tareas que implican una mayor concentración o planeación permanecen afectadas. Los endofenotipos candidatos cognitivos incluyen problemas de memoria, control ejecutivo y concentración⁽²¹⁾.

El 50% de los pacientes presenta microcefalia. Típicamente se afecta la corteza prefrontal, el lóbulo parietal y el hipocampo, mientras que el área del cuerpo calloso suele estar incrementada, los estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) funcional, han demostrado que los pacientes con SDe122q11.2 muestran funciones cerebrales diferentes de los controles durante las tareas matemáticas. Otros hallazgos anatómicos incluyen al vermis pequeño, observado típicamente en los pacientes con espectro autista. El vermis posterior parece tener control sobre la conducta social y su alteración puede explicar la dificultad social en algunos pacientes con la delección. Por otro lado la disminución volumétrica cerebral a nivel fronto-temporal se ha asociado a un mayor riesgo a desarrollar esquizofrenia⁽²²⁾.

El trastorno bipolar, espectro autista, esquizofrenia o trastorno esquizoafectivo se reporta en el 10-30% de los adolescentes y adultos con SDe122q11.2.

Uno de los genes más estudiados en relación a los trastornos neurocognitivos es el *COMT*, que se encuentra en la región 22q11.2 y codifica a la enzima Catecol-O-metiltransferasa que tiene un papel crucial en el metabolismo de la dopamina y norepinefrina en la corteza prefrontal, cuya actividad enzimática se ha visto alterada en asociación al polimorfismo *COMT Val158Met*⁽²³⁾ con resultados controversiales. Otros genes candidatos en la región 22q11.2 que también se encuentran en estudio en relación a los trastornos psiquiátricos y de la conducta en SDe122q11.2 son *PIK4CA*, *GNB1L*, *RTN4R*, *DGCR8*, *ZDHHC8*,⁽²⁴⁾ *CLDN5*, *ARVCF* y *SNAP29*⁽²⁵⁾.

Investigaciones recientes basadas en el alto grado de conservación de genes en la región 22q11.2 que codifican a ciertas enzimas mitocondriales como prolina deshidrogenasa, indican que al menos *PRODH* y *SLC25A1*, podrían estar implicados en la etiología de los trastornos cerebrales asociados a SDe122q11.2 al afectar procesos celulares como migración celular, apoptosis y sinapsis, generando retraso en el desarrollo, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson e inclusive Alzheimer⁽²⁶⁾.

2.1.7 Alteraciones otorrinolaringológicas

Las dismorfias más frecuentes de los pabellones auriculares son sobreplegamiento y engrosamiento del hélix, pabellones auriculares prominentes y acopados, baja implantación, rotación posterior y microtia. Se ha reportado que los pacientes con SDel22q11.2 sufren de problemas de sordera hasta en el 38% de los casos, el 68% de éstos es conductiva y en 32% puede ser mixta o puramente neurosensorial⁽²⁷⁾; por lo regular existe una historia de otitis media recurrente o crónica, que puede requerir miringotomía o timpanoplastía y además, se presentan trastornos del equilibrio, debido a alteraciones cocleares y vestibulares⁽²⁸⁾.

Del 46 a 69% de los pacientes presentan alteraciones palatinas⁽²⁹⁾, como paladar hendido con o sin labio hendido, úvula bífida o paladar hendido submucoso; se observa también insuficiencia velofaríngea (voz hipernasal), membranas laríngeas, parálisis de cuerdas vocales, estrechamiento glótico o subglótico, laringomalacia, traqueomalacia, entre otras, que genera dificultad y/o retraso en el desarrollo del lenguaje en el 70% de los pacientes⁽³⁰⁾. La hipernasalidad responde parcialmente a la intervención quirúrgica pero la fonación permanece alterada en muchos pacientes.

2.1.8 Anomalías renales

Aproximadamente 36% de los pacientes presentan riñones anormales y la frecuencia de falla renal es de 10% en adultos. Las alteraciones más frecuentes en edad adulta son hidronefrosis (7.7%) y agenesia (6%). Mientras que en los niños son más frecuentes la hipoplasia y/o agenesia (17%), poliquistosis (10%) y reflujo vesicoureteral (4%)⁽³¹⁾.

2.2 Embriología

En la cuarta semana de gestación, la región faríngea del intestino anterior forma una serie de bandas visibles desde el exterior del embrión que se denominan arcos branquiales, los cuales están formados por una bolsa endodérmica, una región central de mesénquima (mesodermo y cresta neural) y una hendidura ectodérmica externa; durante el desarrollo embrionario estas estructuras sufren una serie de remodelaciones para dar lugar a la formación de diferentes estructuras de la cara y el cuello⁽³²⁾. Muchos de los tejidos y estructuras alteradas en el SDel22q11.2 derivan de las células de la cresta neural (CCN) que migran, se distribuyen y forman los tejidos y órganos de la tercera y cuarta bolsa faríngea.

Bajo la acción del factor de transcripción TBX1 en la superficie del ectodermo faríngeo al regular vías de señalización no del todo conocidas, las células de la cresta neural (CCN) provenientes del cerebro anterior, entre la placóda ótica y la somita 3 migran ventrolateralmente para poblar los arcos faríngeos en donde contribuyen a la formación de varias partes del paladar, faringe y cara; interactúan con el endodermo faríngeo y forman el timo y la glándula paratiroides y la interacción con el mesodermo da como resultado las células de músculo liso del arco aórtico y sus ramas⁽³³⁾ (Figura 1).

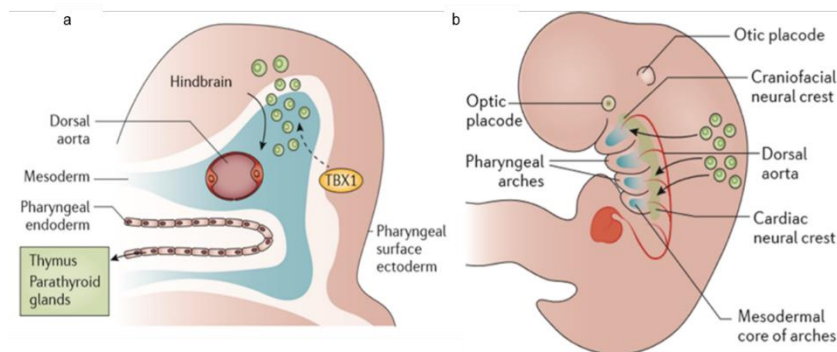


Figura 1. Embriología de los arcos faríngeos

a) Se observa el cerebro anterior y las Células de la cresta neural en círculos verdes, bajo la acción del factor TBX1 que migran hacia los arcos faríngeos, donde interactúan con el endodermo faríngeo para formar el timo y las glándulas paratiroides. b) Se observa la migración de las CCN a los arcos faríngeos y su interacción con el mesodermo (azul) para formar la región craneofacial y cardíaca ⁽³²⁾.

En el desarrollo de la región cardiovascular, las células progenitoras del campo cardiaco secundario (SCC) migran y se distribuyen en el tubo cardiaco primitivo, así el segmento anterior del SCC contribuye al tracto de salida (TSC) y el ventrículo derecho (VD) del corazón; mientras que el segmento posterior del SCC contribuye a la porción interna del corazón, de tal forma que cuando estas células se disrumpan puede resultar un tronco arterial común, defectos del septo o de alineamiento. El Sistema bilateral de arcos aórticos se desarrolla secuencialmente conforme los segmentos faríngeos y permite que la sangre fluya del tubo cardiaco a la aorta dorsal. Los 2 primeros arcos forman lechos capilares, posteriormente los arcos 3, 4 y 6 sufren una remodelación asimétrica y persisten como parte de los grandes vasos (Figura 2) ⁽³⁴⁾.

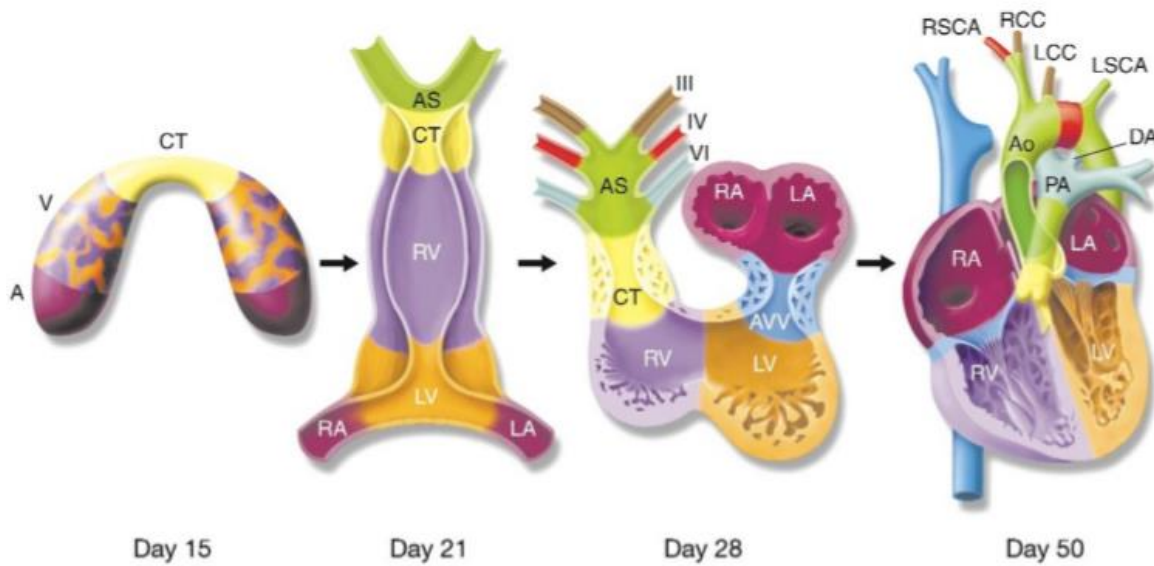


Figura 2. Desarrollo de la región cardiovascular

Representación esquemática de la cardiogénesis, se muestran en colores las regiones morfológicas desde una vista ventral. En el día 15 se observan los precursores que formarán los segmentos específicos del tubo cardiaco primitivo el día 21, las cuales posteriormente se plegarán (día 28) para formar las cámaras del corazón. Las CCN migran al Sistema simétrico bilateral de arcos aórticos, dónde los arcos III, IV, VI y el Saco Aórtico (AS) darán origen al Arco aórtico maduro (día 50) A, aurícula; Ao, aorta; AAV, Válvulas auriculoventriculares; CT, troncoconal; DA, conducto arterioso; LA, aurícula izquierda; LCC, carótida común izquierda; LSCA, arteria subclavia izquierda; LV, ventrículo izquierdo; PA, arteria pulmonar; RA, aurícula derecha; RCC, carótida común derecha; RSCA, arteria subclavia derecha; RV, ventrículo derecho; V, ventrículo; ⁽³⁴⁾.

2.3 Mecanismo de la delección

El origen del SDe122q11.2 puede observarse desde dos perspectivas, uno es el mecanismo que produce la delección y el otro es el mecanismo por el que la delección conduce al fenotipo clínico. Desde 1993 la delección se relacionó con la presencia de elementos tipo repetidos en bajo número de copias (del inglés LCR: *Low Copy Repeats*) los cuales son secuencias de nucleótidos con una homología del 97-98% que median la recombinación homóloga no alélica y predisponen a alteraciones en el número de copias (delecciones o duplicaciones). Se han caracterizado 8 LCR en la región 22q11.2, designadas de la A a la H o del 2 al 8⁽³⁵⁾; en esta región se encuentran más de 30 genes, incluido *TBX1* (Figura 3).

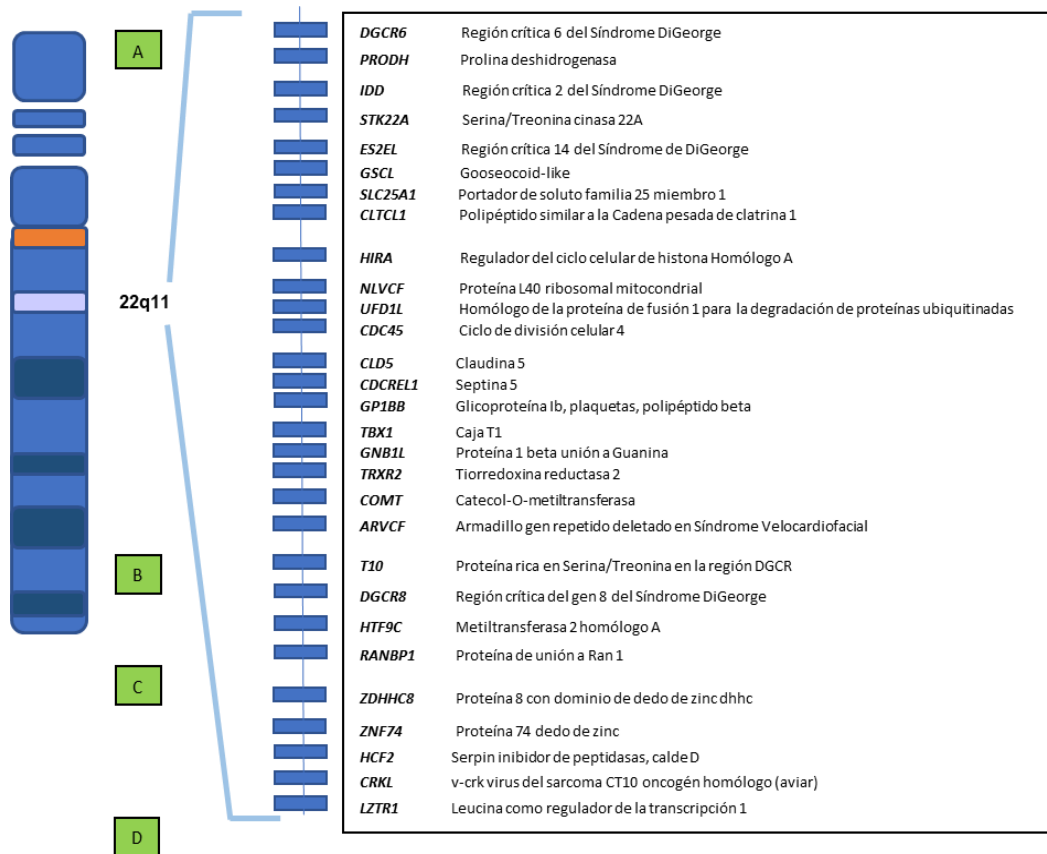


Figura 3. Región 22q11.2 Genes y Low Copy Repeats (LCR) A-D.

Se observa la región crítica 22q11.2 (caja azul claro en el cromosoma 22), los Low Copy Repeats A, B, C y D (cajas verdes), y los genes de la región (cajas azules).

En el 90% de los casos, los individuos tienen una delección de 2.54 Mb (históricamente conocida como 3Mb)⁽³⁶⁾ que abarca los LCR más grandes, LCR22A al LCR22D, flanqueados por los marcadores D22S427 y D22S306/308 en 22q11.2. Esta banda cromosómica pertenece a la serie de bandas con mayor concentración de la familia H3 isocore, la cual tiene una alta concentración de GC (>52%), una gran densidad génica, replicación temprana y comparte 250 kb de secuencias duplicadas en un rearrreglo complejo. Debido a lo anterior, éstos pueden ser proclives a un mal alineamiento, dando lugar a un intercambio desigual durante la meiosis, con una replicación asincrónica en el sitio de la delección; lo que incrementa aún más el mal alineamiento de los LCR. Por otro lado, algunos pacientes muestran una delección de 1.5 Mb en el extremo proximal de la RTD22, flanqueada por los LCR A y B, que comparten un bloque común de 135 kb.

Si bien la mayoría de las alteraciones genómicas en el cromosoma 22 están mediadas por LCR, esto es, causadas por mal alineamiento durante la recombinación homóloga no alélica o recombinación desigual intracromosómica e intercromosómica durante la meiosis; se han propuesto otros mecanismos para explicar la formación de las alteraciones en el número de copias (delecciones/duplicaciones) como terminaciones finales no homólogas (del inglés NHEJ: *nonhomologous end joining*), replicación inducida por ruptura, mediada por microhomología y Repetidos en tándem de número variable (del inglés VNTRs: *variable number tandem repeats*) mediados por rearrreglos genómicos⁽³⁷⁾.

Se han descrito varios pacientes con alteraciones atípicas dentro de la delección típica de 3Mb (RTD); es decir, que presentan delecciones con diferentes puntos de ruptura dentro de la región proximal de la delección o bien, con alteraciones

en el número de copias involucrando otros LCR (Figura 4), inclusive distales a la región 3 Mb⁽³⁸⁾.

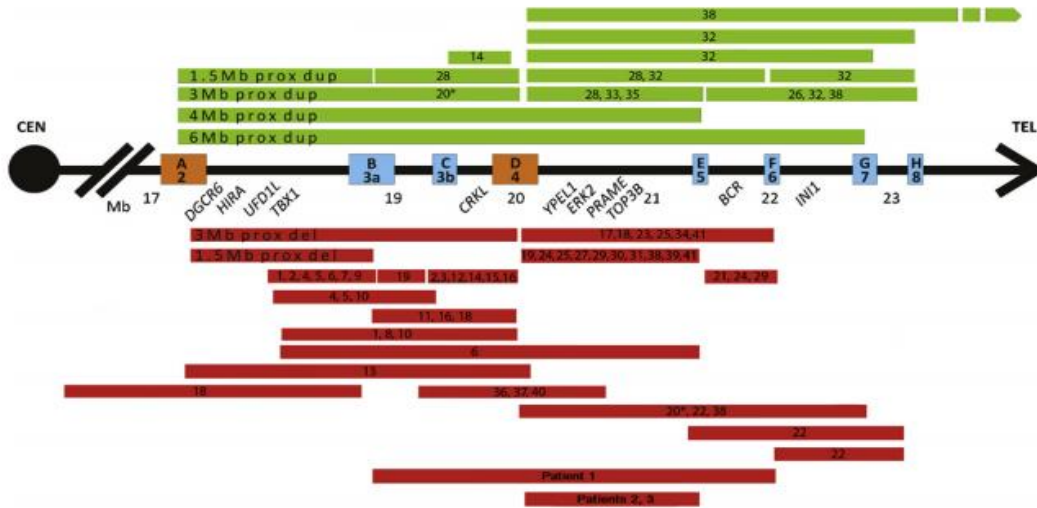


Figura 4. RTD y Deleciones atípicas.

La deleción más común de 3Mb observada en 90% de los pacientes, ocurre entre los LCR (Low Copy Repeats) A-D. El 8% de los pacientes tiene una deleción de 1.5 Mb que involucra los LCR A-B, mientras que el resto de los pacientes tienen deleciones de diferentes tamaños que involucran diferentes LCR fuera de la región típica de deleción (RTD) de 3 Mb (deleciones atípicas)⁽³⁷⁾.

Las deleciones que ocurren dentro de los LCR no conocidos pueden estar mediadas por bloques duplicados de LCR de menor tamaño, o por otro mecanismo desconocido. En 2006 se realizó la caracterización molecular de las secuencias de los puntos de ruptura, en una deleción de 2.3 Mb⁽³⁹⁾, en donde se describió una secuencia común, para ambos puntos de ruptura, con más de 90% de homología entre ellos y también con secuencias Alu. Lo anterior llevó a la conclusión de que los LCR contienen elementos altamente repetitivos, como los elementos Alu, que pueden estar implicados en los rearrreglos cromosómicos.

La variabilidad fenotípica y la heterogeneidad en la extensión de la del22q11.2, indican que debe existir un mecanismo molecular complejo que explique la base de estas deleciones. En 1999 se realizó la secuenciación completa del

cromosoma 22 y se han identificado 45 genes en la RTD 22q11.2. Sin embargo, no se ha podido establecer una correlación entre la severidad del trastorno y el tamaño de la deleción, como lo muestran diferentes estudios en gemelos y miembros de la misma familia con idénticas deleciones y diferentes fenotipos⁽⁴⁰⁾. Esto sugiere la coexistencia de la deleción con otras variantes en el genoma, que pueden actuar como modificadores, mutaciones somáticas, así como la ocurrencia de eventos estocásticos durante la embriogénesis y la exposición desconocida a factores ambientales durante el embarazo⁽⁴¹⁾.

2.4 Diagnóstico

El diagnóstico se sospecha clínicamente; sin embargo, en ocasiones es confuso o puede retrasarse debido a la expresividad variable del fenotipo o bien porque los pacientes no presentan características clásicas del SDe122q11.2, pero una vez establecida la sospecha diagnóstica se tiene que confirmar posteriormente mediante estudios de citogenética molecular o pruebas de biología molecular.

Los estudios de citogenética clásica difícilmente permiten detectar la del22q11.2, ya que por lo general el cariotipo es ineficaz para detectar alteraciones cromosómicas menores de 5-10 megabases (Mb), por lo que se prefiere el uso de citogenética molecular por medio de la Hibridación Fluorescente *In situ* (del inglés FISH: Fluorescence *in situ* hybridization) con las sondas comerciales N25 y/o TUPLE1 (Figura 5), las cuales generalmente están limitadas a una sola secuencia blanco, por lo que no son capaces de detectar deleciones proximales o distales a la sonda empleada.

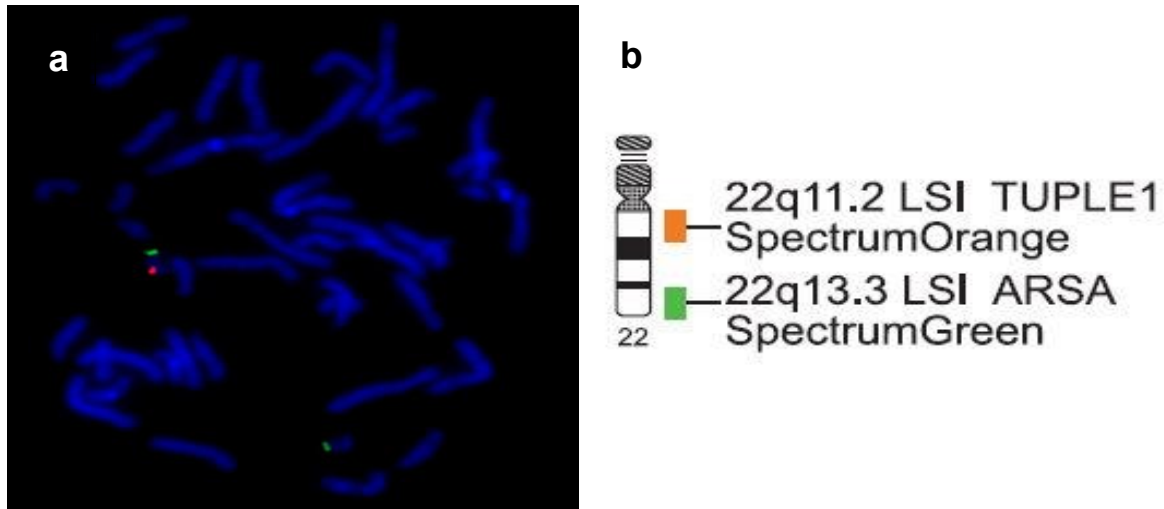


Figura 5. FISH en SDe122q11.2.

a) Paciente portador de la del22q11.2 (Técnica de FISH, UMAE HP CMN S.XXI). La señal roja indica la región 22q11.2 (Sonda *TUPLE1*) y la señal verde la región control terminal del cromosoma 22 (*ARSA*). El Cromosoma con la deleción muestra únicamente la región en control verde. b) Representación esquemática del cromosoma 22 mostrando las sondas de FISH 22q11.2 LSI *TUPLE1* Spectrum Orange (Sonda Identificadora locus específico 22q11.1 *TUPLE1* espectro naranja) y 22q13.3 LSI *ARSA* Spectrum Green (Sonda Identificadora locus específico 22q13.3 espectro verde) utilizadas (<https://www.molecularcatalog.abott>).

Se han desarrollado técnicas más sofisticadas para el diagnóstico, de las cuales algunas cayeron en desuso como CGH (Hibridación Genómica Comparada), prefiriéndose CGH-microarreglos (array-CGH)⁽⁴²⁾ y MLPA (del inglés: Multiplex ligation dependent probe amplification/ Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligamiento) la cual ha emergido como una técnica efectiva de bajo costo, con la que se puede obtener el diagnóstico en menor tiempo y que permite analizar otras regiones cromosómicas como 10p12-15, 8p21-p23, 4q22-q35, 17p13 y 18q21 que también se han relacionado con el fenotipo del SDe122q11.2; además que puede ser empleada en el diagnóstico prenatal con un tiempo de resultado menor a 24 horas⁽⁴³⁾.

Basado en la técnica de MLPA ha surgido CNV-plex, la cual permite un análisis submicroscópico de la región 22q11.2 mediante un sistema de ligación y 4 pares de primers universales que simplifican el diseño de sondas y por tanto flexibilizan el experimento⁽⁴⁴⁾. Cabe señalar que existe un grupo de pacientes con el fenotipo sugestivo del SDe122q11.2 que no muestran ninguna aberración cromosómica con las técnicas mencionadas anteriormente, en quienes se han detectado mutaciones puntuales en *TBX1* mediante secuenciación.

2.5 Manejo Clínico

El manejo de los pacientes con SDe122q11.2 es altamente dependiente de la edad y del fenotipo. Aunque la mayoría de los pacientes reciben el diagnóstico después del nacimiento por la presencia de una cardiopatía congénita, se deben buscar otras manifestaciones clínicas que requieran una intervención inmediata como hipocalcemia, inmunodeficiencia severa o malrotación intestinal⁽⁴⁵⁾. La dificultad en la alimentación y del lenguaje, así como la falla para crecer en la infancia necesitan atención cuidadosa, mientras que hay que tener consideraciones adicionales en el desarrollo cognitivo y crecimiento durante los años escolares. Las alteraciones del comportamiento se acentúan conforme se incrementa la edad del paciente. En la adolescencia y juventud temprana es necesario atender los problemas psiquiátricos.

Las implicaciones quirúrgicas en el SDe122q11.2 no son conocidas del todo, se sabe que el riesgo quirúrgico es bajo en la mayoría de los pacientes: sin embargo, se ha observado mayor incidencia de hemorragia posquirúrgica a causa de un menor número de plaquetas y alteraciones en el gen que codifica a la glicoproteína (GP) I β , que se localiza en la región crítica de la deleción y que forma el complejo GPIIb-V-IX en la superficie plaquetaria, donde funciona como receptor del Factor Von Willebrand (VWF) cuya unión es importante para iniciar la hemostasis. Por otro lado, se ha observado que los pacientes que han sido sometidos a bypass presentan menos alteraciones cognitivas⁽⁴⁶⁾. Los factores que afectan el cuidado clínico antes

de la cirugía son: la monitorización de la concentración del calcio sérico y la identificación de una inmunodeficiencia severa, incluso, como se mencionó previamente, menos del 1% de los pacientes no tienen células T y requieren protección específica de infecciones y productos sanguíneos, ya que contienen linfocitos que pueden inducir enfermedad de trasplante contra huésped, la cual es casi siempre fatal, además de infecciones oportunistas como *Citomegalovirus* (CMV) y *Pneumocystis jiroveci*. Una estrategia en estos casos consiste en irradiar todos los productos sanguíneos, o bien, estratificar el riesgo de acuerdo a la cuenta de linfocitos absolutos; aunque esta medición no es sensible ni específica. Cabe mencionar que la irradiación de los productos sanguíneos es costosa y puede generar cambios sutiles en los electrolitos dentro de los productos sanguíneos.

Además, los pacientes no deben ser inmunizados con vacunas de virus vivos, por el riesgo de desarrollar enfermedad diseminada por virus atenuados. Por otro lado, los pacientes con defectos tímicos leves, con cuentas TCD4+ mayores de 400 cél/ml, pueden recuperar su función a través de un trasplante de células T maduras o a través de trasplante tímico⁽⁴⁷⁾.

2.6 Riesgo de recurrencia

El 93% de los pacientes presenta una delección *de novo* y se considera un riesgo de recurrencia del 1 al 3%. En el restante 8-10%, alguno de los padres presenta la delección y el riesgo de transmisión a la descendencia es del 50%, en estos casos hasta en el 70% de los casos la delección es de origen materno⁽⁴⁸⁾. Los casos familiares de SDe122q11.2 se explican por mosaicismo parental (mosaicismo germinal) e igualmente por lo regular es de origen materno⁽⁴⁹⁾; sin embargo, en ciertos trastornos genómicos recurrentes algunos haplotipos se relacionan con eventos de Recombinación homóloga no alélica (RHNA); en este sentido, en los padres de pacientes afectados por la del22q11.2 se han encontrado inversiones en regiones críticas, variaciones en los LCR que flanquean las regiones críticas o bien

alteraciones en factores reguladores de la recombinación meiótica como PRDM9 y variaciones en la metilación del DNA que predisponen a RHNA⁽⁵⁰⁾.

Muchos pacientes con el fenotipo clásico de SDe122q11.2 no presentan la del22q11.2 clásica, lo cual resulta importante ya que, el riesgo de recurrencia permanece desconocido en ellos. De tal forma que es fundamental un diagnóstico preciso para poder ofrecer un asesoramiento genético adecuado.

3 ANTECEDENTES

A nivel mundial se ha tratado de definir la población a la que hay que someter a estudios para diagnosticar la del22q11.2 y se ha hecho un esfuerzo por contar con pruebas moleculares más sensibles y con mayor especificidad, que a su vez tengan un menor costo y se pueda contar con un resultado en un menor tiempo⁽⁵¹⁾. Algunos estudios realizados en grandes poblaciones, detectaron una prevalencia de la del22q11.2 en 1.1 a 8.1% de los pacientes con cardiopatías congénitas o al menos una manifestación extracardíaca del SDe22q11.2, cabe mencionar que existe una gran variabilidad en el fenotipo cardíaco cuya causa no se conoce, no obstante, no se relaciona con el sexo, raza o tamaño de la deleción. Por otro lado, en estudios realizados en pacientes con cardiopatías troncoconales, la incidencia de la deleción fue del 4.7% ⁽⁵²⁾ a 45% en neonatos ⁽⁵³⁾ y 5.8% en adultos estudiados ⁽⁵⁴⁾, esto es debido a que algunas cardiopatías congénitas en pacientes con la del22q11.2 son graves y pueden ser letales en los periodos fetal y perinatal, lo que impacta la sobrevivencia y el estudio de los pacientes, de tal forma que la incidencia puede estar sesgada con respecto a cuáles de los pacientes asintomáticos, con la deleción y anomalías troncoconales hayan sido estudiados y en segundo lugar, el estudio de los adultos con expresividad mínima, que generalmente se retrasa hasta que tienen niños afectados.

Aproximadamente 50% de los pacientes con Interrupción del Arco Aórtico tipo B (IAA-B) presentan del22q11⁽⁵⁵⁾, por lo que debido a su alto valor predictivo positivo, este grupo de pacientes siempre debe ser estudiado, inclusive cuando no existen manifestaciones adicionales de SDe22q11.2. Igualmente deben ser estudiados los pacientes con Tronco Arterioso, Doble vía de salida del Ventrículo derecho y Tetralogía de Fallot, sobre todo, si ésta se acompaña de otras alteraciones como anomalías del arco aórtico⁽⁵⁶⁾, de las ramas pulmonares o hallazgos extracardíacos, pues únicamente se ha detectado la del22q11.2 en 6% de las formas aisladas⁽⁵⁷⁾ o bien se ha descartado⁽⁵⁸⁾.

3.1 Genes implicados

Durante el desarrollo de las cardiopatías congénitas observadas en el SDel22q11.2, se asocian las alteraciones de las células de la cresta neural y el segundo campo cardíaco desde donde migran y se distribuyen al tubo cardiaco primitivo para formar el tracto de salida del corazón. En cuanto al fenotipo cardiaco, se han implicado algunos genes, entre ellos *TBX1*, *CRKL* y *HIRA*, de los cuales los dos primeros son esenciales para el funcionamiento de FGF8 (del inglés Fibroblast Growth Factor 8: Factor de Crecimiento de los Fibroblastos 8) y son importantes para la sobrevivencia, proliferación y migración de las células de la cresta neural.

3.1.1 Gen *TBX1* (T-BOX 1)

El gen *TBX1* (*602054 OMIM)⁽⁵⁹⁾ (Figura 6) se localiza en el brazo largo del cromosoma 22, en la posición 11.21. (19,756,702-19,783,592 NCBI)⁽⁶⁰⁾. Fue identificado y secuenciado en la región 22q11 en 1997 y está formado por 9 exones; pertenece a una larga familia de factores de transcripción que poseen un dominio de unión a DNA conocido como T-box⁽⁶¹⁾.

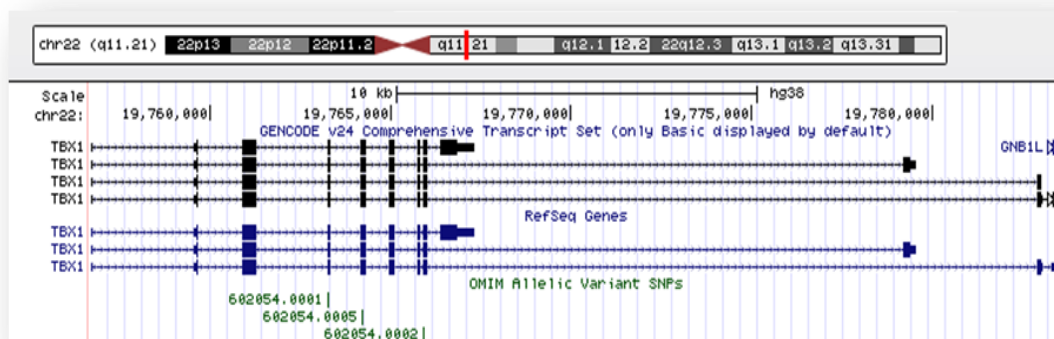


Figura 6. Estructura del gen *TBX1*.

Se muestran en cajas negras los exones 1-9 y en línea punteada los intrones del gen *TBX1*. **Chr22:** Cromosoma 22; **Kb:** kilobases; **p:** brazo corto; **q:** brazo largo. (<http://genome.ucsc.edu>).

Durante la embriogénesis, la expresión de *TBX1* requiere una regulación espaciotemporal muy precisa controlada por vías de señalización y factores de transcripción como Wnt y SHH en diversos tejidos que forman el aparato faríngeo (3ª y 4ª bolsas endodérmicas o faríngeas, ectodermo superficial y mesodermo no derivado de la cresta neural) a partir del cual se forman los músculos y huesos de la cara y el tórax superior, así como las estructuras de los oídos, paladar, dientes, timo, tiroides y paratiroides y los grandes vasos⁽⁶²⁾.

Se han hecho numerosos esfuerzos para identificar los genes blanco del factor *TBX1* durante el desarrollo y se ha mostrado que regula directa o indirectamente vías señalización importantes como Delta-Notch, Ácido Retinoico, *FGF8* y *FGF10* (Fibroblast growth factor 8 y 10) quienes promueven el crecimiento de células adyacentes y además son importantes para la sobrevivencia, proliferación y migración de las células de la cresta neural⁽⁶³⁾.

El gen *TBX1*, juega un papel muy importante en la cardiogénesis, ya que regula indirectamente la migración de las células de la cresta neural (CCN), a través de la activación de la expresión del gen homeobox *GBX2* y la vía Slit/Robo⁽⁶⁴⁾ en el epitelio faríngeo superficial para la formación del 4º arco; también se ha demostrado la influencia de *TBX1* sobre la diferenciación de las células de la cresta neural al interactuar con las proteínas morfogenéticas óseas (del inglés BMP's: Bone Morphogenetic Proteins) y con SMAD7 (un inhibidor de TGFβ/BMP) para diferenciar las CCN hacia células de músculo liso vascular (MLV) y producir matriz extracelular (MEC) alrededor del 4º arco faríngeo⁽⁶⁵⁾.

Recientemente, se identificó un reservorio de células progenitoras en el mesodermo faríngeo, denominado campo cardiaco secundario (SCC) donde *TBX1* mantiene la población de dichas células progenitoras cardiacas a través del incremento de la proliferación celular e inhibición de la diferenciación de los cardiomiocitos; a partir de éste SCC las células migran gradualmente para formar el tracto de salida, ventrículo derecho y partes del atrio⁽⁶⁶⁾.

TBX1 también se expresa en una pequeña porción de células que se convierten en cardiomiocitos en el tracto de salida en el campo anterior cardiaco;

estas células pueden marcar un camino para la migración subsecuente de las células de la cresta neural, o pueden ser fundamentales para la formación de ciertas estructuras. La cascada molecular a nivel cardiaco no se ha descrito por completo; sin embargo, el patrón parece ser el mismo que en las estructuras cervicales con *ISL1* (islet-1) regulando a *SHH* (Sonic hedgehog homolog)⁽⁶⁷⁾.

TBX1 también activa la expresión de *MYF5* (Myogenic factor 5) y *MYOD1* (Myogenic Differentiation 1) que regulan el desarrollo de los músculos branquiméricos, cuyo desarrollo aberrante puede explicar la insuficiencia velofaríngea⁽⁶⁸⁾; así mismo, regula la expresión de *PITX2* (paired-like homodomain transcription factor 2), el cual es importante para el cierre corporal, desarrollo craneofacial y asimetría derecha-izquierda durante el desarrollo cardiaco⁽⁶⁹⁾. Se ha propuesto que el gen *TBX1* también puede explicar las alteraciones esqueléticas distales, vertebrales y renales (fenotipo no branquial) mediante su expresión en el desarrollo del mesodermo y en el esclerotomo⁽⁴⁷⁾.

El desarrollo humano es sensible a las variaciones de la dosis génica de *TBX1* y la haploinsuficiencia de este gen conduce a estructuras precursoras más pequeñas o alteradas. Se han descrito mutaciones (F148Y, G310S y 1223delC) que explican SDe122q11 o SVCF en pacientes sin del22q11.2⁽⁷⁰⁾ así como la disrupción de la homeostasis del Ácido retinoico que puede alterar la expresión de *TBX1* causando daño en el desarrollo de los arcos faríngeos y da origen a una fenocopia de SVCF en fetos expuestos a retinoides⁽⁷¹⁾.

3.1.2 Gen *HIRA/TUPLE 1* (Histone Cell Cycle Regulator)

El gen *HIRA/TUPLE1* (*600237 OMIM)⁽⁷²⁾(Figura 7) se localiza en el extremo proximal de la TDR22 (pb 22:19,330,700-19,431,695 NCBI)⁽⁶⁰⁾, se toma como referencia para el diagnóstico citogenético a través de la técnica de FISH, cuya sonda híbrida en esta región.

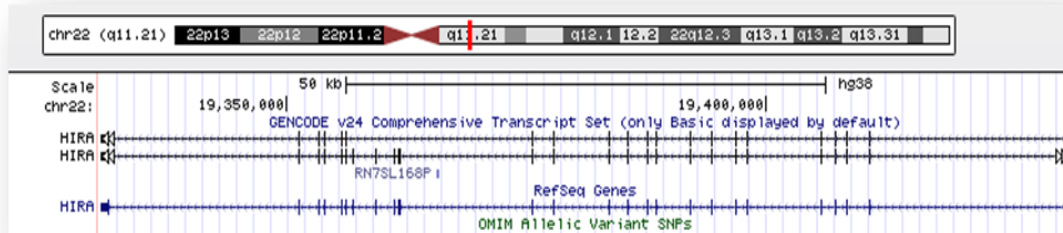


Figura 7. Estructura del gen *HIRA/TUPLE1*

Se muestran en líneas verticales los exones 1-28 y en líneas punteadas los intrones del gen *HIRA*. **Chr22:** Cromosoma 22; **Kb:** kilobases; **p:** brazo corto; **q:** brazo largo. (<http://genome.uscs.edu>).

Este gen codifica para una chaperona de histonas H3-H4, la cual es conservada evolutivamente y localiza preferencialmente a la variante de histona H3.3⁽⁷³⁾ para su replicación independiente y ensamblaje de nucleosomas, de esta manera modula la expresión génica y juega un papel importante en los cambios irreversibles del ciclo celular y la formación de los sitios de heterocromatina; además está implicada en varios procesos incluyendo el desarrollo embrionario, angiogénesis, senescencia celular y envejecimiento⁽⁷⁴⁾.

Se ha observado su expresión en el corazón durante la tabicación del tracto de salida cardiaco, por lo que se considera un fuerte gen candidato en el desarrollo de defectos cardíacos en el SDe122q11.2. Por otro lado, presenta un transcrito “encriptado”, denominado 22k48, dentro del primer intrón⁽⁷⁵⁾ el cual transcribe desde la cadena opuesta y se expresa en todos los tejidos humanos. Muestra similitud con secuencias aisladas en primates no humanos, pero no en ratones. La función biológica exacta de éste transcrito aún no es clara, pero aparentemente tiene un

papel importante en la regulación génica. Es posible que en el citoplasma 22k48 reconozca proteínas para formar partículas de ribonucleoproteínas (complejo SRP), las cuales son cruciales para el importe de proteínas hacia el retículo endoplásmico. El complejo SRP está constituido por 6 proteínas y RNA7S, que las mantiene ensambladas. El transcrito 22k48 contiene secuencias aceptoras y donadoras de splicing no convencionales, que típicamente involucran snRNAs U11 y U12, presenta además elementos repetitivos que pueden provocar cambios en la estructura de la cromatina que simulan deleciones, las cuales ocurren frecuentemente en esta región.

3.1.3 Gen *CRKL* (V-CRK Avian Sarcoma Virus CT 10 Oncogene Homolog Like, CRK-Like proto-oncogene, adaptator protein)

El gen *CRKL* (*602007 OMIM)⁽⁷⁶⁾(Figura 8) se encuentra dentro de la región 22q11.2 (22:20,917,397-20,953,748 NCBI)⁽⁶⁰⁾ cercano al LCR-D .

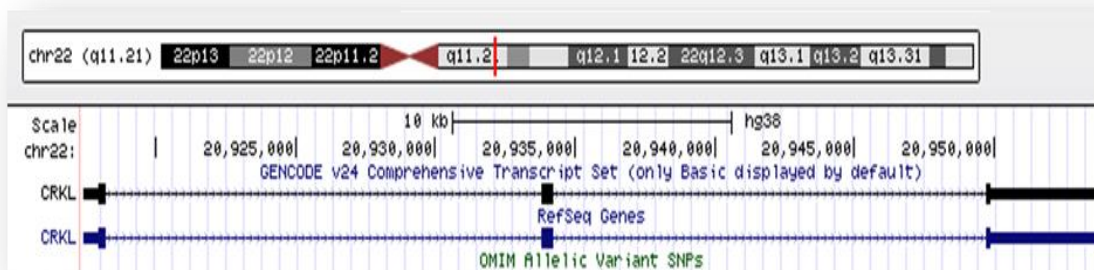


Figura 8. Estructura del gen *CRKL*

Se muestran en cajas negras los exones 1,2 y 3 y en líneas punteadas los intrones del gen *CRKL*. **Chr22:** Cromosoma 2; **Kb:** kilobases; **p:** brazo corto; **q:** brazo largo. (<http://genome.uscs.edu>).

CRKL es una cinasa perteneciente a una familia de proteínas que codifica para una molécula adaptadora citoplasmática involucrada en la señalización de factores de crecimiento como Fgf y TGF β , recluta y activa complejos de señalización en las adhesiones focales, actúa como transductor de señales intracelulares vía abajo de varias clases de Receptores de Tirocin Cinasa (del inglés RTK's: Receptor

of Tyrosine Kinases) que convergen en la vía Mapk/Erk. Es el sustrato de la tirosina cinasa BCR-ABL y se ha postulado que puede ser oncogénica ya que contiene dominios SH2 y SH3 (homología src) que han mostrado activar las vías de JUN y RAS (factores de transcripción) que transforman los fibroblastos en una forma RAS dependiente. También se ha descrito una posible interacción con el ácido retinoico y en la vía de señalización de endotelina de forma directa o mediante transactivación vía los receptores de tirosin cinasa⁽⁷⁷⁾.

A pesar de tener una expresión ubicua, la proteína CRKL es más abundante en la región faríngea y neural, así como en las crestas neurales, dónde resulta necesaria para el desarrollo del timo, glándulas paratiroides, arco aórtico y corazón. En modelos murinos *Crkl* *-/-*, los ratones presentan características cardiovasculares, craneofaciales y glandulares del SDe122q11.2 ⁽⁷⁸⁾.

Existe la hipótesis de que FGF8 y el adaptador CRKL funcionan en una vía molecular común, de tal forma que cuando se disrumpe dicha asociación, por haploinsuficiencia de *CRKL*, se reducen las señales de FGF8 necesarias para el desarrollo cardiovascular temprano y la sobrevivencia de embriones, así como el patrón y longitud de los elementos óseos de las extremidades y el paladar óseo, contribuyendo así a la patogénesis del SDe122q11.2⁽⁷⁹⁾.

Recientemente, se encontró que la heterocigocidad de *CRKL* contribuye a defectos en el desarrollo del tracto genitourinario incluyendo al riñón, tanto en humanos como en modelos animales⁽⁸⁰⁾.

3.2 Análisis molecular

A pesar de que la región crítica del SDe122q11.2 se secuenció en 1999 y por tanto se conocen las secuencias completas de los más de 30 genes incluidos en dicha región, aún se desconoce la función de todos ellos. Por otro lado, existen pacientes con fenotipo del SDe122q11.2 que no presentan la deleción⁽⁸¹⁾, lo cual tal vez podría explicarse por la presencia de mutaciones puntuales o deleciones atípicas en esta región que pueden estudiarse con técnicas de mayor resolución ⁽⁸²⁾.

Dentro de las técnicas que permiten establecer el diagnóstico en estos casos se encuentra MLPA, que detecta amplificaciones o deleciones de 1 a 500 pb, a lo largo de una o varias regiones del genoma de manera precisa, rápida, sensible y con alto rendimiento⁽⁸³⁾.

En el caso del SDe122q11.2 se cuenta con el kit MLPA SALSA P250 DiGeorge (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands®), mediante el cual se pueden detectar microduplicaciones y microdeleciones en 22q11.2 y otras regiones genómicas previamente asociadas con cardiopatías congénitas sindrómicas (con o sin otras características físicas del SDe122q11.2)⁽⁸⁴⁾. El kit de MLPA P250 contiene 48 sondas, 31 localizadas en el cromosoma 22 y 17 en las regiones 4q35, 8p23, 9q34, 10p12, 10p14 y 17p13.

La técnica estándar requiere un mínimo de 20ng de DNA y se basa en la cuantificación de sondas que son añadidas a muestras de DNA genómico y amplificadas de forma múltiple. La cantidad relativa de cada producto de PCR es proporcional al número de copias de la secuencia blanco, dichos amplificados se separan por electroforesis capilar (Applied Biosystems™) y los datos se analizan utilizando el software Coffalyser (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands®).

Diversos estudios reportan que existe una gran correlación entre los resultados de FISH y MLPA; sin embargo, en casos donde el FISH resulta negativo a la deleción, por su diseño y resolución MLPA logra identificar deleciones atípicas con una sensibilidad del 95 al 99% y una especificidad del 97 al 99% en un menor tiempo que el FISH, sin necesidad de realizar cultivo de linfocitos, a un menor costo

y con una cantidad pequeña de DNA con posibilidad de emplear muestras almacenadas por largo tiempo⁽⁸⁵⁾.

Dentro de las deleciones atípicas de la RTD reportadas en la literatura mundial, se encuentran LCR A-D+, que es una variante de la deleción de 3Mb, la deleción de 1-5Mb (LCR A-B) y la variante de 2Mb (LCR A-C), de las cuales se han podido establecer relaciones genotipo-fenotipo a nivel individual pero que no han resultado en las mismas características físicas en diferentes pacientes con la misma deleción, orientando a que existen otros mecanismos como mutaciones puntuales en *TBX1*, factores epigenéticos o modificadores genéticos que pueden regular o contribuir en la variabilidad del fenotipo⁽⁸⁶⁾.

A través de los años se han encontrado pacientes con características clínicas inusuales asociadas al fenotipo de SDe122q11.2; una posible explicación es la existencia de una mutación en el alelo no deletado que además puede resultar en la concurrencia de un trastorno recesivo⁽⁸⁷⁾; por lo que resulta importante considerar su estudio, el cual se puede abordar con nuevas técnicas como High Resolution Melting (HRM) que se ha convertido en una herramienta poderosa post-PCR para la genotipificación y búsqueda de mutaciones, ya que con el fluoróforo LC Green que se intercala en el DNA de doble cadena, permite la monitorización del decaimiento de la fluorescencia según las diferentes temperaturas de disociación de las muestras, identificando rápidamente mutaciones en diversas enfermedades genéticas⁽⁸⁸⁾. Las ventajas aparentes incluyen velocidad de análisis, ausencia de preparación y separación de los productos de PCR; además de que cuenta con una sensibilidad y especificidad muy elevada (100%) para la detección de amplicones de menos de 400 pb y para los amplicones entre 400 a 1000pb es de 96.1 a 99.4%.

Finalmente, contar con los resultados de los pacientes que presentan deleciones atípicas y mutaciones o polimorfismos en genes localizados en la RTD resulta importante ya que permitiría construir una base de datos común que haría posible establecer conclusiones y unificar criterios clínicos y moleculares para establecer el diagnóstico correcto de SDe122q11.2⁽⁸⁹⁾.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de la genética molecular ha permitido la identificación de los genes involucrados, tanto en la etiología primaria, como en los factores de riesgo significativos para el desarrollo de anomalías cardíacas y vasculares; sin embargo, su uso real en el marco clínico sigue siendo limitado, en parte debido a los altos costos y los recursos que implica, así como a la compleja heterogeneidad genética. En el presente trabajo se pretende analizar la región 22q11.2 y detectar deleciones atípicas mediante la técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) así como identificar y caracterizar variantes en la secuencia de DNA de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* en pacientes portadores del fenotipo del SDe122q11.2 y en pacientes con cardiopatías troncoconales aisladas.

5 JUSTIFICACIÓN

El síndrome de la deleción 22q11.2 es relativamente frecuente y tiene una alta incidencia de malformaciones cardíacas, principalmente de tipo troncoconal; sin embargo, presenta una gran heterogeneidad clínica y genética, lo cual dificulta su diagnóstico, por lo que es necesario identificar y caracterizar variantes en la secuencia del DNA de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* implicados en la cardiogénesis, así como descartar deleciones atípicas en la RTD. Lo anterior permitirá otorgar asesoramiento genético y generará conocimiento para contar con riesgos de recurrencia más confiables en este grupo de pacientes, en quienes los tratamientos actuales han incrementado la sobrevida hasta la edad reproductiva, con un a probabilidad del 50% de transmitir la enfermedad a su descendencia.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Realizar el análisis molecular de la RTD y de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* en pacientes con datos fenotípicos del espectro de la deleción 22q11.2 y en pacientes con cardiopatía troncoconal aislada.

6.2 Objetivos secundarios

- Identificar deleciones atípicas en la RTD, por medio de FISH y MLPA en pacientes con fenotipo del SDe122q11.2 y en pacientes con cardiopatía troncoconal aislada
- Realizar el análisis molecular de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* mediante HRM, en pacientes con datos fenotípicos del espectro de la deleción 22q11.2 y en pacientes con cardiopatía troncoconal aislada.
- Determinar si existe una relación genotipo-fenotipo en los pacientes estudiados.
- Determinar casos familiares y ofrecer asesoramiento genético

7 MATERIAL Y MÉTODOS

A los pacientes referidos al servicio de Cardiopediatría, con diagnóstico clínico cardiológico y ecocardiográfico de cardiopatía troncoconal, se les realizó historia clínica completa y exploración física detallada por médico genetista. Posteriormente se tomó una muestra de 5 a 10ml de sangre periférica y se recolectó en 2 tubos diferentes, 3ml en tubo de heparina y 3 a 5ml en un tubo de EDTA para realizar los siguientes estudios:

1. Cariotipo convencional con bandas GTG con una resolución de 450-550 bandas, con lectura de 20 metafases (Ver Anexo 2,3)

2. Estudio de FISH con sonda TUPLE1 utilizando como control la sonda ARSA (22q13.3) (DiGeorge Region Probe-LSI TUPLE1 Spectrum Orange/LSI ARSA Spectrum Green, Vysis) (Ver Anexo 4)
3. Análisis molecular de la región 22q11.2 mediante MLPA (SALSA MLPA P250 DiGeorge probemix, MRC Holland®) (Ver Anexo 6)
4. Identificación de variantes de las regiones codificantes de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL*, mediante técnica High Resolution Melting (HRM, Thermo Fisher Sci®) (Ver Anexo 7).

- **Tipo de estudio:** observacional, descriptivo, transversal
- **Selección de la muestra:** a conveniencia por consecuencia
- **Universo de estudio:** pacientes referidos al Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez y del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” con cardiopatía congénita y fenotipo compatible con el SDel22q11.2 y pacientes con cardiopatía troncoconal aislada valorados por Cardiólogo y Médico genetista.
- **Criterios de inclusión:**
 - Pacientes mexicanos, hijos de padres mexicanos y abuelos nacidos en México
 - Ambos sexos
 - Cualquier edad
 - Cuenta con valoración cardiológica y Ecocardiograma
 - Cuenta con valoración por Médico genetista
 - Pacientes portadores de cardiopatía congénita troncoconal
 - Fenotipo del SDel22q11.2
 - Aislada
 - Autorice formar parte del estudio mediante firma del consentimiento informado

- **Criterios de exclusión:**

- No acepte formar parte del estudio
- Pacientes con cardiopatía troncoconal que cuenten con otro diagnóstico sindrómico emitido por Médico genetista
- Pacientes en los que no se puede obtener suficiente muestra para realizar estudios de citogenética y biología molecular
- Muestras en las que se presente degradación del DNA

8 ANÁLISIS

- Se realizó un análisis descriptivo: frecuencias, porcentajes de manifestaciones clínicas en los pacientes positivos y negativos a la Deleción 22q11.2 (Correlación genotipo-fenotipo, incluyendo a las deleciones atípicas).
- Los hallazgos de MLPA fueron analizados mediante el Software Coffalyser HRM-Holland Inc®).
- Los hallazgos de HRM fueron analizados mediante High Resolution Melt (HRM) Software 2.0.2, de Applied Biosystems™

9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se apegó a los lineamientos éticos contemplados para la investigación en seres humanos de la Declaración de Helsinki y de acuerdo al apartado II del artículo 17 en el título segundo del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, este trabajo se consideró con riesgo mínimo.

El procedimiento consistió en tomar una muestra de sangre de 5 a 10 ml mediante punción venosa o vía catéter central (en caso de que el paciente haya sido sometido a cateterismo), recolectadas en tubo de Heparina y otro de EDTA, posteriormente las muestras fueron procesadas mediante técnicas de citogenética y biología molecular en el Laboratorio de Genómica del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”.

POTENCIALES BENEFICIOS: en base a los resultados obtenidos del análisis molecular del DNA, es probable que el paciente no haya recibido ningún beneficio directo del estudio; sin embargo, su participación ayudó al avance del conocimiento de la Deleción 22q11.2 y de las cardiopatías troncoconales. Por otra parte, en aquellos casos con detección de alteraciones genéticas, se les otorgó asesoramiento genético por un Médico genetista. Así mismo, se les ofreció a los progenitores el análisis citogenético y molecular para conocer sus riesgos de recurrencia de la Deleción 22q11.2, incluyendo variantes atípicas con técnicas diferentes a las habitualmente empleadas.

POTENCIALES RIESGOS: los posibles riesgos son aquellos relacionados con la extracción de la sangre, como la presencia de hematoma, equimosis, síncope y rara vez infección. Existe un potencial riesgo psicológico y estrés relacionado con la presencia de mutaciones o detección de la Deleción 22q11.2, para lo cual los padres y/o los pacientes recibieron asesoramiento genético, consistente en una amplia explicación de la enfermedad, cuidados generales y supervisión de la salud, así como referencia a las especialidades correspondientes de manera preventiva, incluyendo apoyo psicológico.

BALANCE RIESGO BENEFICIO: se considera que los potenciales beneficios están proporcionados a los potenciales riesgos de la investigación.

SELECCIÓN JUSTA DE LOS PARTICIPANTES: todos los pacientes con cardiopatía troncoconal fueron invitados consecutivamente a formar parte del estudio y se incluyeron una vez que los padres y/o pacientes firmaron el consentimiento informado.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD: toda la información recabada durante el estudio es absolutamente confidencial y con fines de investigación, se etiquetó con un código y se almacenó en una base de datos segura a la que únicamente los investigadores responsables tienen acceso. En caso de publicación de los resultados o presentación de los mismos en eventos científicos, no se dará información que pudiera revelar la identidad del paciente o su familia. En los casos de pacientes positivos para la delección 22q11.2, el resultado se informó al médico cardiólogo tratante y los pacientes fueron referidos a las especialidades necesarias para su atención integral.

CONSENTIMIENTO INFORMADO: el consentimiento informado se solicitó por parte de la alumna de maestría a los padres de los pacientes (y/o pacientes), una vez que se confirmó el diagnóstico con la valoración cardiológica y Ecocardiograma. Se utilizó un ambiente privado para explicar de una manera sencilla mediante el uso de diapositivas conceptos básicos para comprender el objetivo del estudio, los riesgos y beneficios, así como la posibilidad de retirarse del estudio (retirar el DNA) sin sufrir repercusiones negativas de alguna índole en su atención médica. Se explicó que posteriormente serían contactados para dar a conocer los resultados del paciente y otorgar asesoramiento genético, respondiendo a las dudas sobre los resultados y la información brindada. Finalmente se procedió a firmar el documento del consentimiento informado por parte de los padres y/o pacientes y testigos y se otorgó una copia del mismo a los participantes.

- El presente proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética e Investigación del INCICH (Reg. 12-759).

10 RESULTADOS

Se captaron 96 pacientes de los cuales 1 se eliminó ya que no se obtuvo el cultivo de linfocitos para realizar FISH y tampoco una muestra adecuada para extracción de DNA. En una muestra de 95 pacientes se realizó FISH a 92 pacientes, se obtuvo resultado positivo a la del22q11.2 en el 35.8% (tabla 2). A 87 pacientes se les realizó MLPA con 35.6% de positividad para la del22q11.2 típica y otros cambios atípicos en 9.1% (ver Tabla 5,6 y 7 en dónde se muestran las regiones analizadas en cada uno de los pacientes). El análisis por HRM de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* se realizó a 87 pacientes, en dónde se identificaron diferentes variantes (ver Tabla 8, 9, 10 y 11 en dónde se muestran los cambios en las regiones analizadas en cada uno de los pacientes). Existe un número de pacientes que no se realizó FISH, MLPA y/o HRM por muestra insuficiente o de mala calidad, lo anterior se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de resultados de estudios de FISH, MLPA y HRM en pacientes con datos fenotípicos del espectro de la delección 22q11.2 y en pacientes con cardiopatía troncoconal aislada							
Total n=95	Estudio	n	del22q11.2	Negativo a del22q11.2	Cambios atípicos	Estudio	n
FISH del22q11.2 33	MLPA+	31	30	1	-	HRM+	30
						HRM-	1
	MLPA-	2	NA	NA	NA	HRM+	0
						HRM-	2
FISH Negativo a del22q11.2 59	MLPA+	55	1	-	8	HRM+	54
						HRM-	0
	MLPA-	4	NA	NA	NA	HRM+	0
						HRM-	4
SIN FISH 3	MLPA+	1	-	-	1	HRM+	1
						HRM-	0
	MLPA-	2	NA	NA	NA	HRM+	2
						HRM-	0

FISH. Hibridación Fluorescente in situ. **MLPA** Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligamiento (Multiplex ligation dependent probe amplification). **HRM.** Análisis de alta resolución de fusión (High Resolution Melting). **n** número de pacientes estudiados. **del22q11.2** delección 22q11.2 **(+)** Se realizó el estudio. **(-)** No se realizó el estudio. **NA** No aplica

De la muestra de 95 pacientes con cardiopatías troncoconales, 16 se consideraron tipo aisladas ya que los pacientes no presentaban dismorfias ni retraso en el desarrollo psicomotor y 79 pacientes se consideraron sindrómicos. De los 16 pacientes con CC aisladas, 1 (6.2%) resultó con FISH positivo para del22q11.2, la cual se corroboró mediante MLPA; además en este grupo se detectó una deleción atípica (6.2%), 2 con alteraciones inespecíficas (12.5%), 9 fueron normales (56.2%) y en 3 no se hizo el estudio porque la muestra de DNA fue insuficiente (18%).

En cuanto a los pacientes sindrómicos se obtuvo FISH positivo para del22q11.2 en 32 pacientes (40%) corroborado en 27 pacientes mediante MLPA, 2 pacientes más presentaron deleción atípica y uno de los positivos mediante FISH fue negativo en MLPA; mientras que 8 presentaron alteraciones inespecíficas (10%), 36 fueron normales (45%) y en 5 pacientes no se realizó el MLPA por DNA insuficiente (6.3%). Lo anterior se muestra en la figura 9.

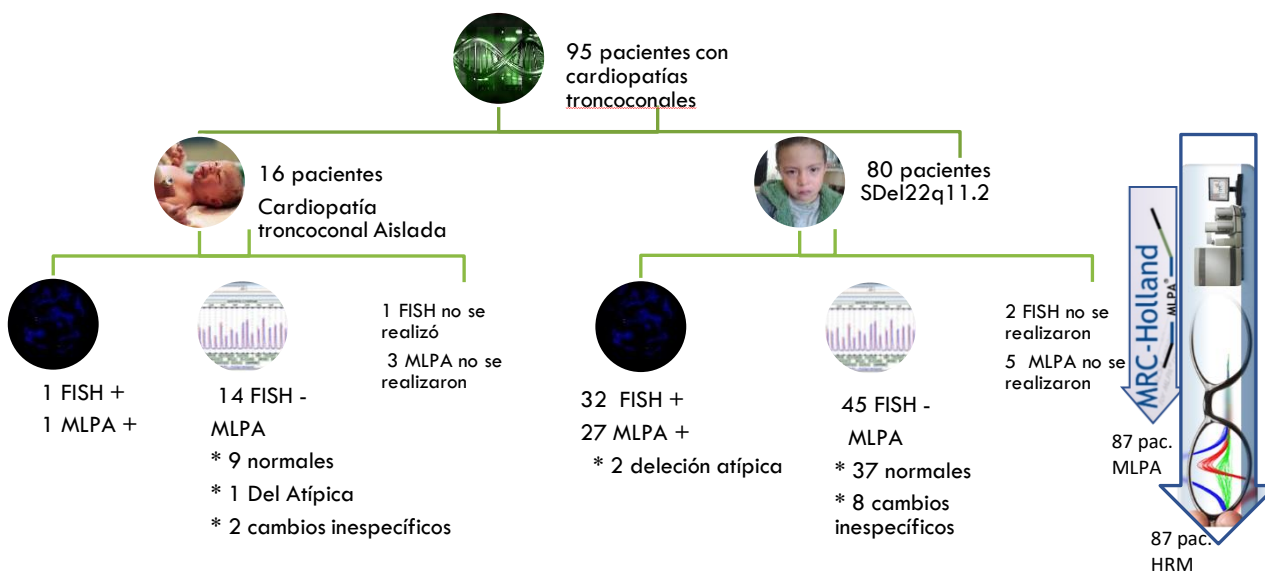


Figura 9. Resultados entre pacientes con Cardiopatía troncoconal aislada y en pacientes sindrómicos

10.1 Frecuencia de sexo y Antecedentes familiares

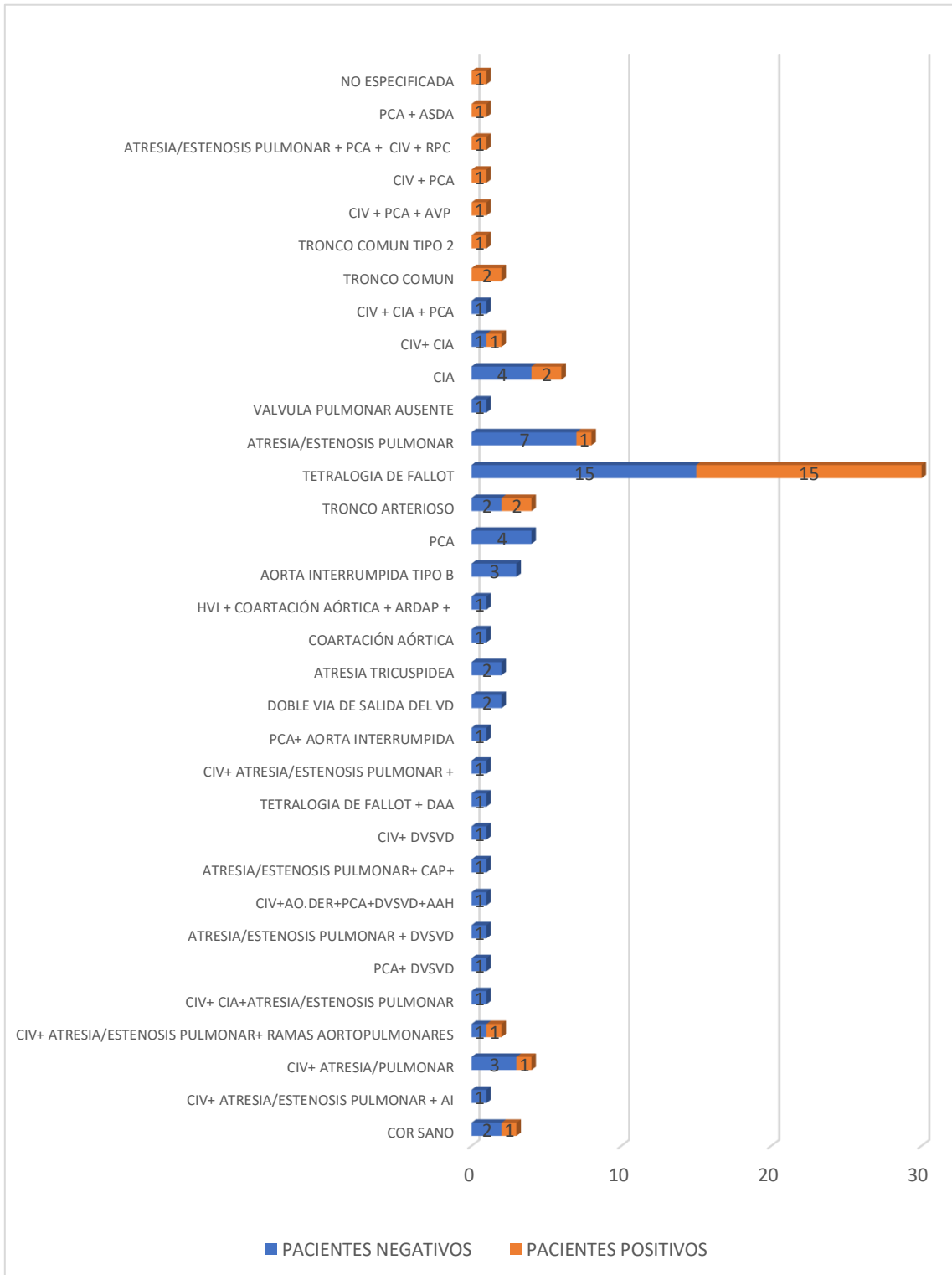
De los 33 pacientes que resultaron positivos por FISH a la del22q11.2, el 42.4% son mujeres y 57.5% hombres. De los pacientes negativos por FISH a la del22q11.2 47.4% son mujeres y 52.5% hombres. En la Tabla 3 se muestran la frecuencia de antecedentes familiares de cardiopatías, paladar hendido, enfermedades mentales y malformaciones.

TABLA 3. FRECUENCIA DE SEXO Y ANTECEDENTES FAMILIARES			
Pacientes Positivos a la del22q11.2 n=33*		Pacientes Negativos a la Del22q11.2 n=59*	
Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
14 (42.4%)	19 (57.5%)	28 (47.4%)	31 (52.5%)
Antecedentes de cardiopatías	10	Antecedentes de cardiopatías	15
Antecedentes de paladar hendido	2	Antecedentes de paladar hendido	0
Antecedentes de enfermedades mentales	8	Antecedentes de enfermedades mentales	13
Antecedentes de malformaciones	3	Antecedentes de Malformaciones	14
*Diagnosticados mediante FISH			

10.2 Frecuencia de Cardiopatías Congénitas

Para el grupo positivo a la delección 22q11.2 las cardiopatías congénitas más frecuentemente observadas fueron la Tetralogía de Fallot (46%), Atresia/Estenosis pulmonar con Comunicación Interventricular y Colaterales Aortopulmonares (6%), Tronco Arterioso (6%); el resto de los pacientes presentaron cardiopatías troncoconales aisladas o complejas y en uno de los pacientes se descartó la CC (Cor Sano). En el grupo de pacientes negativos a la delección, las cardiopatías más frecuentes fueron Tetralogía de Fallot (25%), Atresia/estenosis pulmonar (11%), CIA (6%) y PCA (6%), así como CIV con atresia/estenosis pulmonar (5%), en uno de los pacientes se descartó la cardiopatía congénita (Gráfica 1).

GRÁFICA 1. FRECUENCIA DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN PACIENTES POSITIVOS Y NEGATIVOS A LA DELECCIÓN 22q11.2



10.3 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas más frecuentemente encontradas en los pacientes con del22q11.2 se describen en la Tabla 4 y son las fisuras palpebrales estrechas (36%), hipertelorismo (51%), epicanto (72%), puente nasal ancho (69%) y prominente (57%), punta nasal bulbosa (45%), hipoplasia de ala nasi (63%), pabellones auriculares acopados (39%), concha profunda (28%), comisura de los labios dirigida hacia abajo (57%), boca pequeña (33%) y voz hipernasal (27%); se muestran también otras manifestaciones poco frecuentes (ver tabla 4 y 11).

TABLA 4. FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES CLINICAS EN PACIENTES CON del22q11.2 n=33					
MANIFESTACIÓN		n	%	MANIFESTACIÓN	
Asimetría facial estructural		2	6	Hipotiroidismo	
Facies asimétrica al llanto al nacimiento		1	3	Hipotonía	
Facies hipotónica		1	3	Escoliosis	
Perfil facial plano		10	30	Hiper movilidad articular	
Frente amplia		2	6	Contracturas	
Estrabismo		4	12	Paladar alto	
Fisuras palpebrales estrechas		12	36	Paladar ojival	
Fisuras palpebrales dirigidas hacia arriba		4	12	Paladar hendido	
Hipertelorismo		17	51	Paladar hendido submucoso	
Parpados gruesos		2	6	Oligodontia	
Epicanto		24	72	Boca pequeña	
Telecanto		2	6	Comisura de los labios dirigida hacia abajo	
Puente nasal ancho		23	69	Micrognatia	
Puente nasal prominente		19	57	Constipación	
Punta nasal bulbosa		15	45	ERGE	
Punta nasal bífida		2	6	Hernia inguinal	
Narinas estrechas		11	33	Hernia umbilical	
Hipoplasia de <i>ala nasi</i>		21	63	Criptorquidia	
Dedos largos		6	18	Reflujo genitourinario	
Dedos estrechos		7	21	Piel áspera	
Dedos cónicos		8	24	Sindactilias cutáneas	
Hélix grueso		1	3	Clinodactilia	
Hélix plegado		3	9	Polidactilia	
Lóbulos pegados		1	3	Pie equinvaro	
Pabellones acopados		13	39	Pie plano	
Pabellones pequeños		5	15	Crisis convulsivas	
Asimetría de pabellones auriculares		4	12	Esquizofrenia	
Baja implantación de pabellones auriculares		7	21	Voz hipernasal	
Concha profunda		9	27	Linfopenia	

10.4 Estudios moleculares

En cuanto al MLPA se corroboró la del22q11.2 en 30 pacientes como se muestra en la figura 10. Se excluyeron 2 pacientes (SD55, SD97 debido a que el DNA fue insuficiente. En el caso del paciente con ID SD13-68 se encontró una deleción que no involucra toda la región de 3Mb en 22q11.2 (*CDC45-1*, *GP1BB-2*, *TXNRD2-9*, *KLHL22-2*, *MED15-10*, *SNAP29-5*, *LZTR1-16*) (figura 11), en el paciente SD89 se encontró únicamente una alteración en la sonda *RTDR1-2* (LCR E) y en el paciente SD91 se encontraron deleciones adicionales, fuera de la RTD (*RTDR1-2*, *RAB36-1* (LCR E), *PPP1R3B* [8p23.1], *EHMT1* [9q34.3] y *GATA3* [10p14].(Tabla 5).

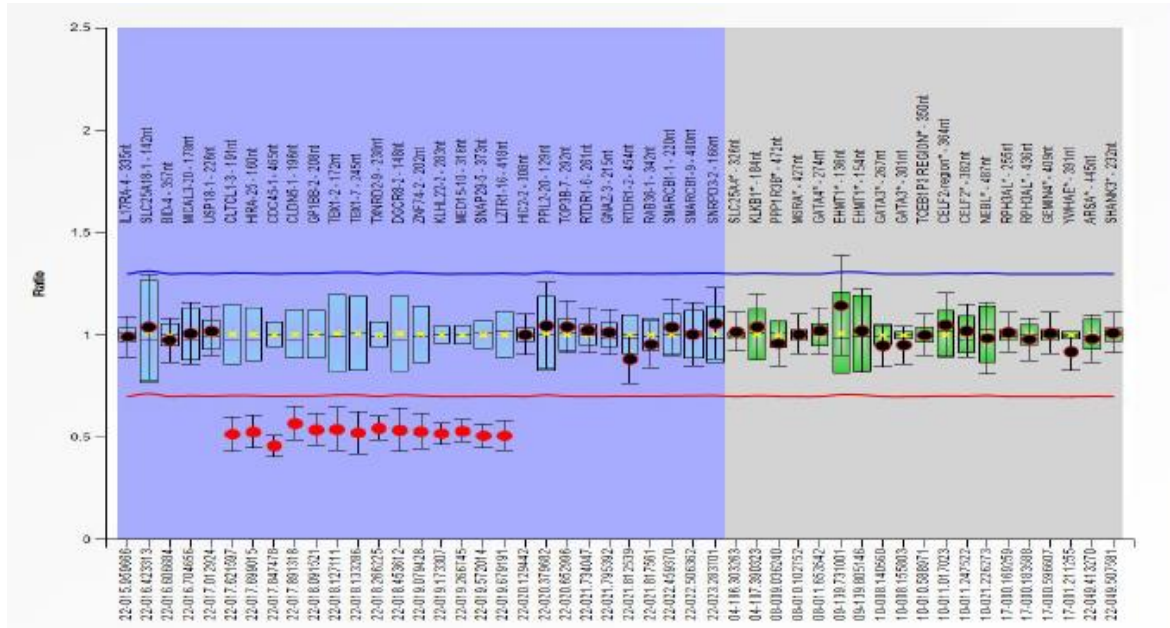
En los pacientes negativos a la del22q11.2 se muestran los resultados del MLPA en las Tablas 6 y 7, así como algunos ejemplos representativos en las figuras 12,13,14 y 15.

En cuanto al análisis mediante HRM de los genes *HIRA*, *CRKL* y *TBX1* se muestran las diferentes variantes de los pacientes negativos a del22q11.2 en las tablas 8, 9 y 10. En los pacientes positivos a del22q11.2 se describen las variantes en HRM de los genes *TBX1*, *HIRA* y *CRKL* en la Tabla 11, dónde se establece la relación genotipo-fenotipo.

TABLA 5. MLPA Y CARIOTIPO EN PACIENTES CON FISH POSITIVO A LA DELECCIÓN																																			
ID PACIENTE	CARIOTIPO												MLPA																						
	SD12-6	SD12-8	SD12-14	SD13-55	SD13-57	SD13-59	SD13-60	SD13-62	SD13-67	SD13-68	SD13-69	SD13-73	SD13-78	SD13-80	SD13-83	SD13-88	SD13-89	SD13-91	SD13-92	SD13-93	SD13-97	SD14-101	SD14-102	SD14-104	SD14-106	SD14-109	SD14-112	SD14-114	SD14-115	SD14-118	SD14-119	SD14-123			
SONDA MLPA	NUC	NUC	NUC	46,XX	NUC	NUC	46,XY, 22 pstk	NUC	NUC	NUC	NUC	NUC	NUC	NUC	46,XY, 9qh+	46,XX	46,XY, 9qh+	NUC	NUC	NUC	46,XY	NUC	NUC	46,XX	46,XY	46,XY	NUC	46,XX	46,XX	NUC	46,XX	46,XX			
IL7RA-4				S																	S														
SLC25A18-1																																			
BID-4																																			
MICAL3-20																																			
USP18-1																																			
CLTCL1-3																																			
HIRA-25																																			
CDC45-1																																			
CLDN5-1																																			
GP1BB-2																																			
TBX1-2																																			
TBX1-7																																			
TXNRD2-9																																			
DGCR8-2																																			
ZNF74-2																																			
KLHL22-2																																			
MED15-10																																			
SNAP29-5																																			
LZTR1-16																																			
HIC2-2																																			
PPIL2-20																																			
TOP3B-7																																			
RTDR1-6																																			
GNAZ-3																																			
RTDR1-2																																			
RAB36-1																																			
SMARCB1-1																																			
SMARCB1-9																																			
SNRPD3-2																																			
SLC25A4*																																			
KLKB1*																																			
PPP1R3B*																																			
MSRA*																																			
GATA4*																																			
EHMT1*																																			
EHMT1*																																			
GATA3*																																			
GATA3*																																			
TCEB1P3																																			
CELF2-reg*																																			
CELF2*																																			
NEBL*																																			
RPH3AL*																																			
RPH3AL*																																			
GEMIN4*																																			
YWHAE*																																			
ARSA*																																			
SHANK3*																																			

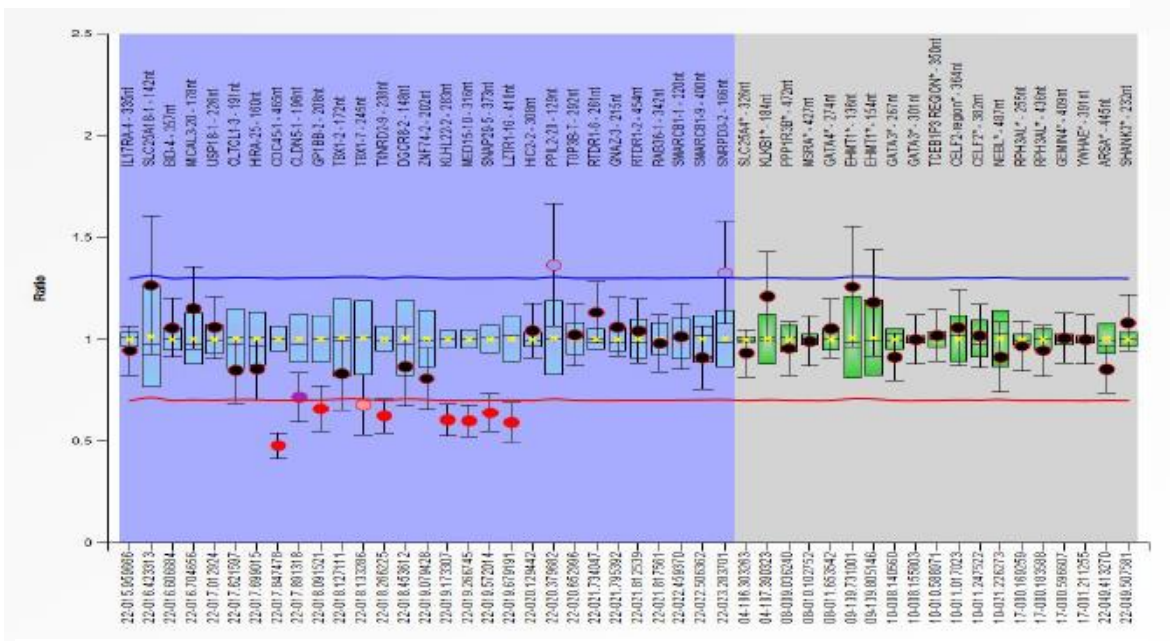
Resultado de MLPA (kit MLPA-P250). La delección está indicada en color Rojo (delección hemicigota), Blanco indica dos copias. Amarillo Cambios inespecíficos. Azul duplicaciones. NUC Núcleos. S Sin DNA.

Figura 10. MLPA con delección en región 22q11.2 en paciente SD14-119



Resultado de MLPA (MLPA kit P-250) en paciente SD14-119. Se observa la delección típica.

Figura 11. MLPA con delección en región 22q11.2 en paciente SD13-68



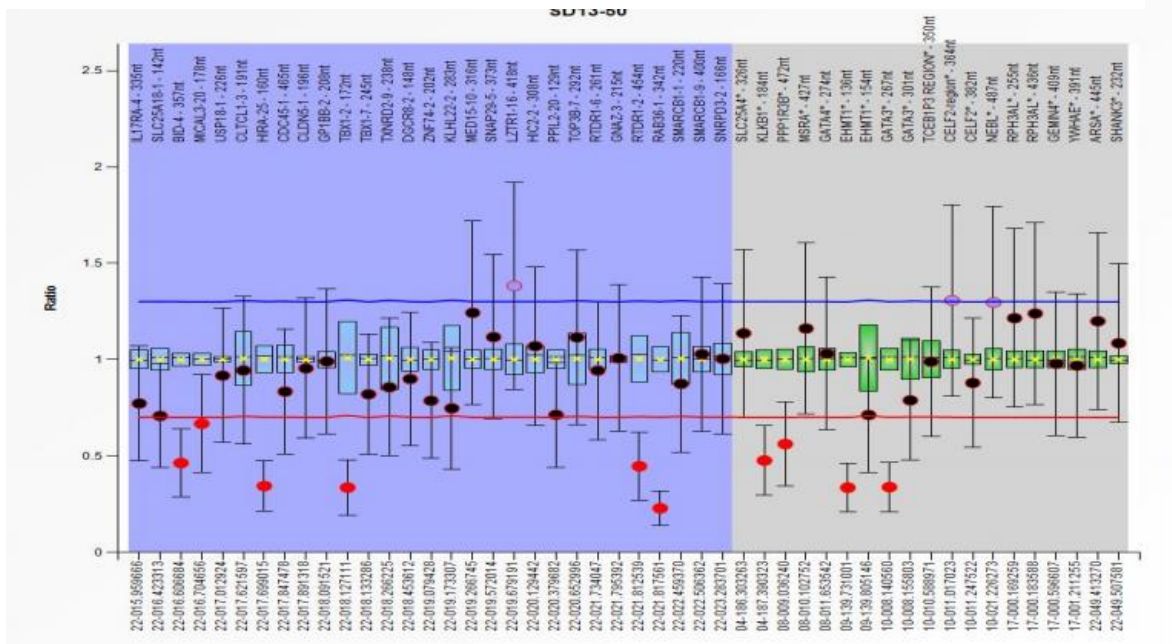
Resultado de MLPA (MLPA kit P-250) en paciente SD13-68. Se observa delección en la RTD sin abarcar todas las sondas.

TABLA 6. MLPA Y CARIOTIPO EN PACIENTES CON FISH NEGATIVO A LA DELECCIÓN

ID PACIENTE	CARIOTIPO																											
	46,XY,9qh+	NUC	NUC	46,XX,16qh+	46,XX,16qh+	46,XX	46,XY	46,XX	46,XX	46,XY	46,XX	46,XY	NUC	NUC	NUC	NUC	NUC	NUC	NUC	46,XY	NUC	NUC	NUC	NUC	46,XX	46,XX	46,XY	
IL7RA-4																												
SLC25A18-1			Am																									
BID-4																												
MICAL3-20																												
USP18-1																												
CLTCL1-3																												
HIRA-25																												
CDC45-1																												
CLDN5-1																												
GP1BB-2																												
TBX1-2																												
TBX1-7																												
TXNRD2-9																												
DGCR8-2																												
ZNF74-2																												
KLHL22-2																												
MED15-10																												
SNAP29-5																												
LZTR1-16																												
HIC2-2																												
PPIL2-20																												
TOP3B-7																												
RTDR1-6																												
GNAZ-3																												
RTDR1-2																												
RAB36-1																												
SMARCB1-1																												
SMARCB1-9																												
SNRPD3-2																												
SLC25A4*																												
KLKB1*																												
PPP1R3B*																												
MSRA*																												
GATA4*																												
EHMT1*																												
EHMT1*																												
GATA3*																												
GATA3*																												
TCEB1P3																												
CELF2-reg*																												
CELF2*																												
NEBL*																												
RPH3AL*																												
RPH3AL*																												
GEMIN4*																												
YWHAE*																												
ARSA*																												
SHANK3*																												

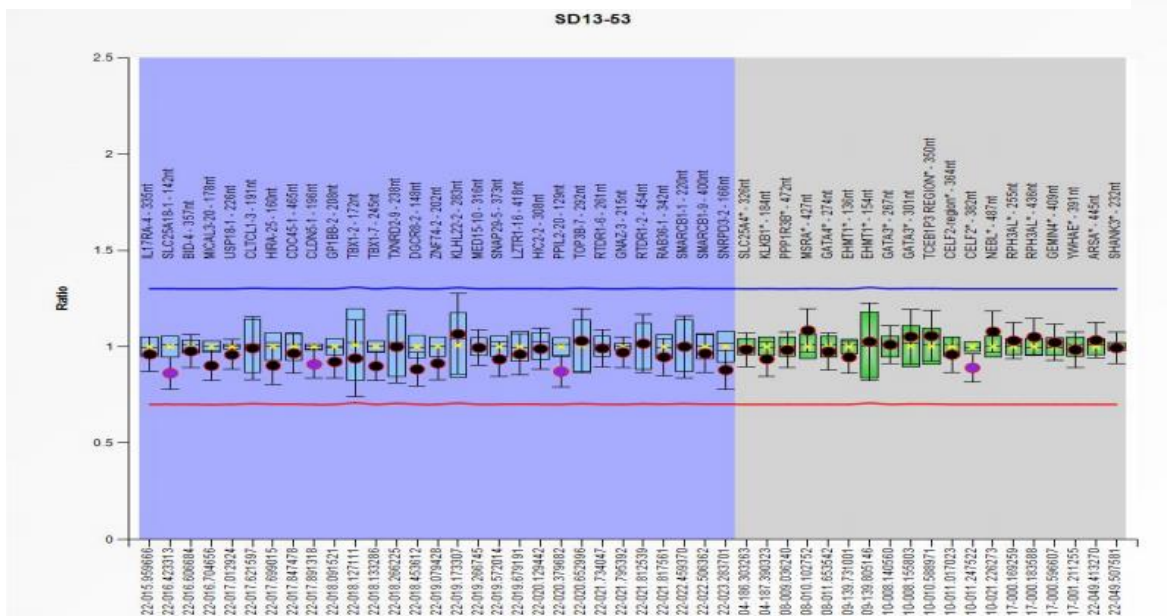
Resultado de MLPA (kit MLPA-P250). La delección está indicada en color Rojo (delección hemicigota), Blanco indica dos copias. Amarillo y Morado. Cambios inespecíficos. Azul Duplicación. NUC Núcleos.

Figura 12. MLPA con delección en región 22q11.2 en paciente SD13-50



Resultado de MLPA (MLPA kit P-250) en paciente SD13-50. Se observa delección en la RTD sin abarcar todas las sondas.

Figura 13. MLPA con cambios inespecíficos en región 22q11.2 en paciente SD13-53



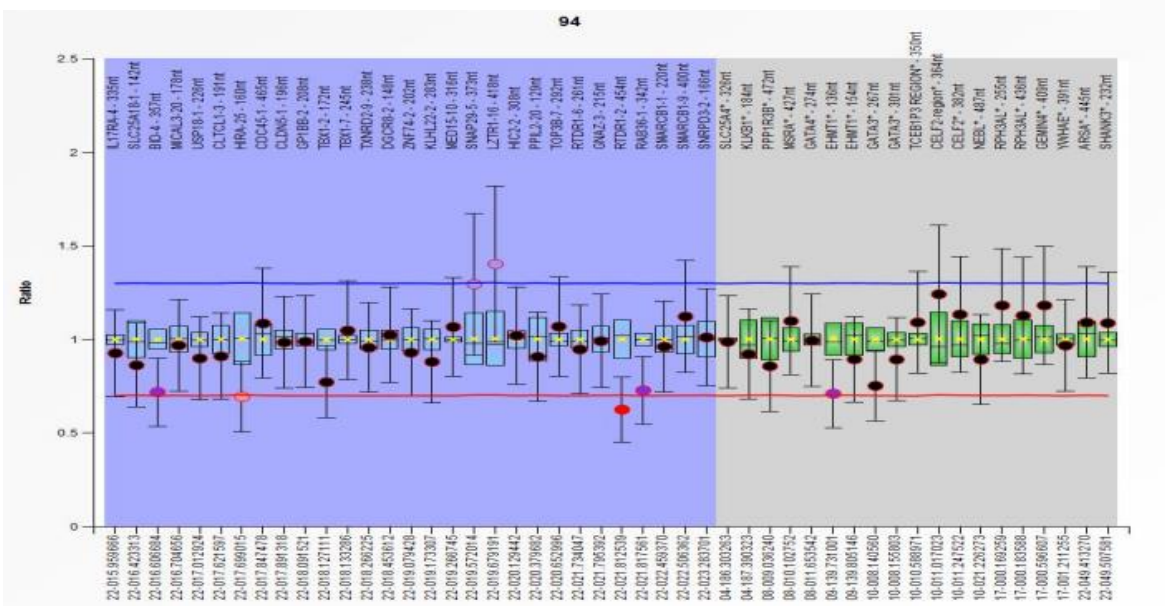
Resultado de MLPA (MLPA kit P-250) en paciente SD13-53. Se observan algunos cambios inespecíficos en la RTD

TABLA 7. MLPA Y CARIOTIPO EN PACIENTES CON FISH NEGATIVO A LA DELECIÓN

SONDA MLPA	CARIOTIPO	SD13-86	SD13-87	SD14-90	SD14-94	SD14-95	SD14-96	SD14-98	SD14-99	SD14-100	SD14-105	SD14-107	SD14-108	SD14-110	SD14-111	SD14-113	SD14-116	SD14-117	SD14-120	SD14-121	SD14-122	SD14-124	SD14-125	SD14-126	SD14-127	SD14-128	SD14-129	
		46,XY	46,XX	46,XY	NUC	46,XY	46,XX	NUC	NUC	NUC	46,XY	46,XY	46,XY	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY	46,XY	46,XY	NUC	NUC	46,XY	46,XX	46,XY, 9qbt+
IL7RA-4																												
SLC25A18-1																												
BID-4					■																							
MICAL3-20																												
USP18-1																												
CLTCL1-3																												
HIRA-25				■																								
CDC45-1																												
CLDN5-1																												
GP1BB-2																												
TBX1-2																												
TBX1-7							■			■	■																	
TXNRD2-9																												
DGCR8-2																												
ZNF74-2																												
KLHL22-2																												
MED15-10																												
SNAP29-5																												
LZTR1-16					■									■														
HIC2-2																												
PPIL2-20																												
TOP3B-7																												
RTDR1-6												■																
GNAZ-3																												
RTDR1-2				■																								
RAB36-1				■																								
SMARCB1-1																												
SMARCB1-9																												
SNRPD3-2												■																
SLC25A4*																												
KLKB1*																												
PPP1R3B*																												
MSRA*																	■											
GATA4*																												
EHMT1*					■							■		■														
EHMT1*																												
GATA3*												■																
GATA3*																												
TCEB1P3																												
CELF2-reg*																	■											
CELF2*																												
NEBL*																	■											
RPH3AL*												■																
RPH3AL*										■																		
GEMIN4*																												
YWHAE*																												
ARSA*														■														
SHANK3*			■																									

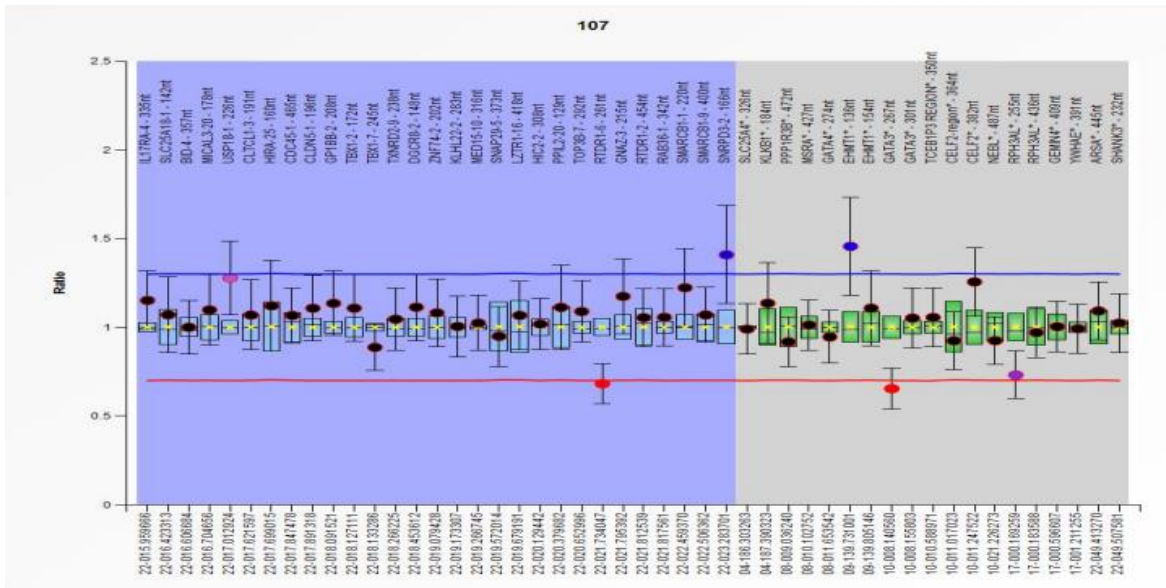
Resultado de MLPA (kit MLPA-P250). La deleción está indicada en color **Rojo** (deleción hemigota), **Blanco** indica dos copias. **Amarillo y Morado**. Cambios inespecificos. **Azul** Duplicación. **NUC** Núcleos.

Figura 14. MLPA con cambios en región 22q11.2 en paciente SD14-94



Resultado de MLPA (MLPA kit P-250) en paciente SD14-94. Se observa deleción en RTDR1-2, duplicación en LZTR1-16 y otros cambios inespecíficos.

Figura 15. MLPA con cambios en región 22q11.2 en paciente SD14-107



Resultado de MLPA (MLPA kit P-250) en paciente SD14-94. Se observa deleción en RTDR1-2, duplicación en LZTR1-16 y otros cambios inespecíficos.

TABLA 8. VARIANTES DEL GEN *HIRA* MEDIANTE HIGH RESOLUTION MELTING EN PACIENTES CON CARDIOPATIA TRONCOCONAL NEGATIVOS A del22q11.2

HIRA A	HIRA2	HIRA 3	HIRA 4	HIRA 5	HIRA 6	HIRA 7	HIRA 8	HIRA 9	HIRA 10	HIRA11	HIRA 12	HIRA 13	HIRA 14	HIRA 15	HIRA 16	HIRA 17	HIRA 18	HIRA 19	HIRA 20	HIRA 21	HIRA 22	HIRA 23	HIRA 24	HIRA 25	HIRA 26	HIRA 27	CC
				SD36 v.2 1/1	SD36 1/1			SD36 v.2		SD36 v.12	SD36 2/C		SD36 1/1		SD36 2/3	SD36 2/2					SD36 1/1			SD36 2/3	SD36 3/3		CIA/CIV
				SD38 1/C		SD38 3/C										SD38 1/1					SD38 1/C						IAA,PCA
					SD39 1/1					SD39 14/15										SD39 5/5							AP,CIV,PCA
					SD41 1/C											SD41 1/C		SD41 3/C									CIA
	SD44 1/1	SD44 4/C	SD44 3/1		SD44 3/C					SD44 3/3			SD44 2/C		SD44 3/C	SD44 2/C					SD44 1/C				SD44 1/2	SD44 3/C	TF
					SD46 5/C																						DVSVD, CC
			SD47 1/C													SD47 1/1											AT
		SD48 5/C		SD48 1/C	SD48 3/C					SD48 3/C					SD48 2/C				SD48 1/C				SD48 1/C		SD48 2/8	SD48 3/4	AP, HTP,CAP,DAA
																							SD49 3/6				CIA,CIV
	SD50 1/C			SD50 3/C		SD50 1/C	SD50 1/C									SD50 1/1									SD50 3/9		TF
				SD51 1/C				SD51 5/C	SD51 1/C															SD51 5/6	SD51 1/C		DVSVD
SD52 8/8		SD52 3/C			SD52 2/C	SD52 3/C			SD52 1/C										SD52 5/C						SD52 7/8	SD52 1/11	TGV
					SD53 1/C										SD53 3/2	SD53 1/C											TF
				SD56 1/C							SD56 1/C																TF
																											TGV
	SD64 1/1									SD64 3/3																	VDH,CC
							SD65 3/C			SD65 3/C																	AP, CIA
																									SD70 10/C	SD70 10/C	AP
																					SD71 1/C						TF
SD72 8/8				SD72 1/C		SD72 3/C	SD72 5/C								SD72 3/1				SD72 2/C				SD72 1/8		SD72 1/7		TF
				SD75 1/C																							S
		SD76 3/C													SD76 3/8	SD76 1/1											AP,CIV
					SD77 1/1					SD77 15/16											SD77 3/6						HVI, COA, ARDAP, VCIP
				SD79 1/C	SD79 5/C																						AP,CIV
SD80 5/6	SD80 1/C		SD80 1/C			SD80 5/C					SD80 5/C													SD80 4/5			TF
			SD81 1/1								SD81 1/3																TC
																					SD82 1/C						ASVP
SD84 5/C		SD84 3/C								SD84 3/C				SD84 1/C													TF
	SD85 1/C																										TF
																									SD86 5/C		AT, TGV
																											CIA, CIV
				SD90 1/C				SD90 3/4	SD90 1/C																		TF
										SD94 2/C						SD94 3/1	SD94 5/C										TF
					SD95 1/1				SD95 1/C																		CAVP, CIA,PCA
				SD98 4/C																					SD98 2/C		AAB, CIV, AP
				SD100 5/C						SD100 10/C																	TA1

SD103 5/C	SD103 1/1		SD103 5/C	SD103 1/2	SD103 1/1			SD103 2/C		SD103 3/C		SD103 1/1			SD103 2/2			SD103 1/1			SD103 1/3		TA2
																			SD105 1/C				PCA
																							IAA
																							TF
																							AP
																							TA
																							TF
																							AP,DX
																							CIA
																							TF
																							TF, DAA
																							TF
																							DVSVD
																							AT
																							DVSVD, EP
																							TF

En la tabla se describen en la parte superior los exones del gen *HIRA*, en la columna extrema derecha se describe el tipo de cardiopatía congénita (CC) que se representan en el centro con diferentes colores y se describen las variantes de cada exón por paciente.

TABLA 9. VARIANTES DEL GEN CRKL MEDIANTE HIGH RESOLUTION MELTING EN PACIENTES CON CARDIOPATÍA TRONCOCONAL NEGATIVOS A del22q11.2

CRKL 1A	CRKL 1B	CRKL 1C	CRKL 1D	CRKL 2A	CRKL 2B	CRKL 3A	CRKL 3B	CRKL 3CD	CRKL 3E	CRKL 3F	CRKL 3G	CRKL 3H	CRKL 3J	CRKL 3K	CRKL 3L	CRKL 3M	CRKL 3N	CRKL 3P	CRKL 3Q	CRKL 3S	CRKL 3T	CC
								SD 36 v.1														CIA/CIV
							SD38 3/4															IAA, PCA
								SD39 v.1									SD39 5/5					AP, CIV, PCA
	SD44 C/1	SD44 C/3						SD44 v.1									SD44 C/2					TF
																	SD47 C/1					AT
SD48 v.1			SD48 1/6		SD48 v.2				SD48 C/1				SD48 C/2		SD48 C/2							AP, HTP, CAP DAA
							SD49 C/2															CIA, CIV
	SD50 2/2						SD50 C/8	SD50 V.9									SD50 V.3		SD50 C/1	SD50 C/1		TF
												SD51 C/2										DVSVD
SD52 5/5							SD52 C/10	SD52 3/3	SD52 C/5									SD52 6/6			SD52 C/1	TGV
								SD53 C/1														TF
			SD63 C/2														SD63 C/1	SD63 v.2				AT
							SD70 2/9						SD70 C/2					SD70 V.1				AP
							SD71 C/2						SD71 C/6				SD71 V.1			SD71 C/2		TF
																		SD72 6/6				TF
								SD75 C/4														S
								SD82 C/1					SD82 C/2									ASVP
		SD84 C/4						SD84 C/7											SD84 C/5			TF
																			SD85 C/2			TF
								SD87 C/2														CIA, CIV
								SD94 1/1					SD94 C/1									TF
							SD95 C/2	SD95 C/6		SD95 C/3			SD95 C/3	SD95 C/2	SD95 C/1							CAVP, CIA, PCA
																	SD98 C/1					AAB, CIV, AP
								SD99 C/1											SD99 C/4			TF
			SD100 8/10				SD100 C/6															TA1
	SD103 C/2			SD103 4/5	SD103 1/1	SD103 2/2	SD103 11/12	SD103 3/3	SD103 4/4	SD103 1/2	SD103 2/2	SD103 C/2					SD103 1/1	SD103 C/5	SD103 1/2	SD103 2/3		TA2
SD108 C/2																	SD108 C/1					TF
		SD111 1/1	SD111 5/6									SD111 C/2										TA
												SD113 C/4										TF
			SD116 8/11	SD116 C/1													SD116 C/1	SD116 V.1				AP, DXM
					SD117 C/3		SD117 2/2	SD117 1/8														AP, CIV, RCC
								SD120 3/3		SD120 5/5			SD120 C/2						SD120 6/6			CIA
																		SD121 C/1			SD121 C/1	TF
					SD122 1/6																	TF, DAA
							SD124 C/5															TF
								SD125 V.1			SD125 C/3						SD125 5/7			SD125 C/3		DVSVD
								SD127 C/1														DVSVD, EP
		SD129 C/4																				TF
																						TF

En la tabla se describen en la parte superior los exones del gen CRKL, en la columna extrema derecha se describe el tipo de cardiopatía congénita (CC) que se representa en el centro con diferentes colores y se describen las variantes de cada exón por paciente

TABLA 10. VARIANTES DEL GEN *TBX1* MEDIANTE HIGH RESOLUTION MELTING EN PACIENTES CON CARDIOPATÍA TRONCOCONAL NEGATIVOS A del22q11.2

TBX1-1	TBX1-2	TBX1-3A	TBX1-3B	TBX1-4	TBX1-5	TBX1-6	TBX1-7/8	TBX1-9A	TBX1-9B	TBX1-9C	TBX1-9D	FENOTIPO
SD36 2/2			SD36 V.2	SD36 1/C	SD36 2/3							CIA/CIV
SD40 1/C												CIA
SD41 2/C												PCA
				SD44 1/C								TF
										SD48 V.4		AP, HTP, CAP, DAA
								SD49 V.4				CIA/CIV
SD52 6/6					SD51 C/1 SD52 2/			SD51 4/5				DVSVD
			SD56 1/C				SD56 C/3					TG
					SD72 2/2							TF
SD75 1/1												S
							SD76 C/2					AP, CIV
SD79 4/4												AP, CIV
							SD82 C/2					ASVP
					SD84 C/1							TF
											SD85 C/2	TF
					SD87 C/1							CIA/CIV
							SD90 C/5	SD90 4/C				TF
SD95 4/4												CAVP, CIA, PCA
								SD98 3/C				AAB, CIV, AP
							SD100 C/3					TA1
				SD103 1/1								TA2
SD105 1/1						SD105 C/1						PCA
SD108 3/C								SD108 6/C				S
SD110 4/C												AP
SD111 4/4												TA
							SD113 C/2					TF
							SD117 C/2					AP, CIV, RCC
SD120 5/7					SD120 4/5	SD120 C/3						CIA
SD127 4/4						SD127 C/1						DVSVD, EP

En la tabla se describen en la parte superior los exones del gen *CRKL*, en la columna extrema derecha describe el tipo de cardiopatía congénita que se representa en el centro con diferentes colores y se describen las variantes de cada exón por paciente

TABLA 11. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN PACIENTES POSITIVOS A del22q11.2

ID	FENOTIPO								MLPA	VARIANTES EN HRM		
	DF	VHN	DL	RPM RM	DA	TC	CC	OTROS		TBX1	HIRA	CRKL
SD12-6	+		+			+	TF	-	T	1	12,20,26	3CD
SD12-8	+			+			TC2	ERGE	T	1,5	2,3,5,6,12, 17,18	3CD,3F, 3J,3Q,3 S
SD12-14	+	+	+	+	+		TF	Criptorquidia, sindactilias	T	*	*	*
SD13-55	+			+			TF	ERGE, crisis convulsivas, hipotonía	*	*	*	*
SD13-57	+	+					TF	Hipotonía, hernia inguinal y umbilical, irritabilidad	T	-	12,17	3K,3S
SD13-59			+				TF	Criptorquidia, constipación crónica	T	1	A,12,17	3H,3N
SD13-60	+			+			CIV PCA	Linfopenia	T+	1	5,11,12,13 ,16,17,21	3CD, 3N,3S
SD13-62							TF	Epicanto	T+	1,9D	6,12	3CD,3J
SD13-67	+			+			TF	Irritabilidad, hernia umbilical, criptorquidia	T			
SD13-68							CIV PCA AVP	Puente nasal ancho, cicatriz umbilical prominente	A		2,4,5,7,17, 21,22,24	3E,3N
SD13-69	+						TA	Dificultad respiratoria	T+		A,2,17,26	3N, 3P,3Q
SD13-73	+			+			TF	ERGE, Hiper movilidad articular	T	1	6	
SD13-74	+	+	+	+	+		AP CIV RAP	Epilepsia del lóbulo temporal, esquizofrenia, hipotiroidismo, escoliosis	T		8,16	3CD
SD13-78	+		+	+			TF	ERGE, sindactilias, teletelia	T		A,17	3CD,3N
SD13-80	+	+	+				TF	Teletelia	T		A,2,4,7,12 ,24	3CD, 3H, 3P
SD13-83	+		+		+		AP	-	T		4,7	
SD13-88	+						AP CIV	Contracturas	T	5,7/8	A,5,7,8,9, 12,20,26	3F,3J,3 P,3S
SD13-89	+			+			CIA	Piel áspera, crisis convulsivas, hernia inguinal	A	9A	4,7,8,20,2 2	3B
SD13-91	+		+				TC	-	T+	1,3B,5, 7/8	A,3,6,7,11 ,14,16,17, 18,22,23, 25, 26	1A,1B,2 B,3A,3B ,3CD,3F ,3G,3H, 3J,3K,3 N,3P,3S
SD13-92	+	+	+	+	+	+	TC	Oligodontia, encías prominentes, hernia umbilical, falanges distales hipoplásicas	T	1	9,17,19	2A, 3CD, 3F, 3N

SD13-93	+					CIA	Pie plano	T	9D	5,6,11,16,19	2B,3E,3L,3N,3S
SD13-97	+	+	+		+	AP CIV RAP	Hipotiroidismo, clinodactilia, hernia inguinal	*	*	*	*
SD14-101	+	+			+	CIV, CIA	Escoliosis, otitis media recurrente, ERGE, contracturas	T		17	3CD, 3N
SD14-102	+					PCA ASDA	ERGE, contracturas	T		5,7,17	3B, 3CD
SD14-104	+		+	+	+	TF	Constipación crónica, hernia umbilical	T	5	A,5,8,14,15	2A,3CD,3F,3M,3P
SD14-106	+				+	AP PCA CIV RPC	ERGE, irritabilidad, dificultad respiratoria	T	2,6	4,11,17	
SD14-109	+	+	+		+	COR SANO	Paladar hendido submucoso, pie equinovaro	T		6,11,17,21	1A,2B,3CD, 3N
SD14-112					+	NE		T		4,8,16,21	1A,2B,3CD,3N
SD14-114	+		+		+	TF	Paladar hendido, polidactilia, hipotonía generalizada, otitis media recurrente, escoliosis, esquizofrenia, linfopenia	T	9C	A,7,16,17,22	3CD,3N,3S
SD14-115	+	+	+			TF	Paladar hendido submucoso	T	7/8	5,21	3J
SD14-118	+					TF		T		3,12,16	3B
SD14-119	+				+	TA	Paladar hendido submucoso	T			3CD, 3N
SD14-123	+				+	+	+	TF		12	

SD Paciente SDe122q11.2 **DF** Dismorfias faciales **VHN** Voz hipernasal **DL** Dificultad en el lenguaje **RPM/RM** Retraso psicomotor/retraso mental **DA** Dificultad en el aprendizaje **TC** Trastorno de conducta **CC** Cardiopatía congénita **ERGE** enfermedad por reflujo gastroesofágico **MLPA** Multiplex Ligation Probe Amplification **A** Deleción atípica **T** Deleción típica **T+** Deleción típica más otras alteraciones **HRM** High Resolution Melting **TF** Tetralogía de Fallot, **TC2** Tronco común tipo 2 **CIV** Comunicación interventricular **PCA** Persistencia del conducto arterioso **AVP** Agenesia de la válvula pulmonar **AP** Atresia pulmonar **RAP** Ramas aortopulmonares **ASDA** Arteria Subclavia derecha aberrante **RPC** Ramas pulmonares confluentes

11 DISCUSIÓN

Las cardiopatías congénitas constituyen las malformaciones congénitas más frecuentes, la prevalencia reportada a nivel mundial va de 2.1 a 12.3 por 1000 recién nacidos, en nuestro país se desconoce su prevalencia real; sin embargo, hay estimados que van de 0.7 a 1%⁽⁹⁰⁾ y según el INEGI constituyen la segunda causa de muerte infantil en México⁽⁹¹⁾; muchas de ellas se desarrollan en el contexto de un síndrome malformativo debido a cromosomopatías, enfermedades monogénicas y teratógenos⁽⁹²⁾.

En su artículo original de 1968, DiGeorge llamó la atención de un síndrome con hipoplasia del timo e hipocalcemia a cuyo espectro clínico se agregaron cardiopatías congénitas y dismorfias faciales. En 1976 Kinouchi y Takao describieron en una publicación japonesa de cardiología un grupo de niños con hipertelorismo, fisuras palpebrales estrechas, boca pequeña, voz hipernasal y anomalías del tracto de salida del corazón, al que llamaron Síndrome de Anomalías faciales Conotruncales⁽³⁾.

En 1978, Shprintzen y sus colaboradores describieron un grupo de pacientes con paladar hendido, cardiopatía y retraso en el desarrollo psicomotor con desarrollo de enfermedad psiquiátrica en la edad adulta⁽⁹³⁾. Posteriormente en 1981, de la Chapelle asoció todas esas entidades a la delección de 3 Mb del brazo largo del cromosoma 22 en la región q11.2 y se englobaron como una sola entidad denominada Síndrome Del22q11.2.

El 90% de los casos de SDel22q11.2 son esporádicos y se presentan en 1 de cada 4000 nacidos vivos⁽²⁾; los síntomas por los que se identifican a los pacientes con la delección son variables; sin embargo, las alteraciones craneofaciales, cardiopatía troncoconal, hipocalcemia, paladar hendido (submucoso), insuficiencia velofaríngea, voz hipernasal, problemas de aprendizaje, inmunodeficiencia o aplasia tímica y trastornos psiquiátricos suelen ser los signos clave de la enfermedad. De las características clínicas en el SDel22q11.2, en el presente estudio se encontraron con mayor frecuencia epicanto, hipoplasia de *ala nasi*, puente nasal ancho/prominente,

comisura de la boca dirigida hacia abajo, además de dificultad en el lenguaje, retraso en el desarrollo psicomotor, hernias inguinales/umbilicales, ERGE y en menor frecuencia esquizofrenia, aplasia de timo y Linfopenia.

De los 95 pacientes con cardiopatía troncoconal, 33 (35.8%) fueron positivos a la delección y la cardiopatía más frecuente fue la Tetralogía de Fallot (46%), siendo ligeramente mayor a lo reportado en la literatura (39%). Por otro lado, a pesar de que la TF es la cardiopatía más frecuente, la que tiene mayor VPP según estudios previos es el Arco Aórtico interrumpido tipo B⁽⁹⁴⁾; sin embargo, en este estudio ninguno de los pacientes con esa cardiopatía presentó la del22q11.2; en cambio, el 50% de los pacientes con TF y Tronco Arterioso fueron positivos.

La región 22q11 es muy inestable y susceptible a mutaciones debido a la presencia de Low Copy Repeats (LCR)s, cuya mala alineación durante la recombinación homóloga no alélica en la meiosis, predispone a esta región a sufrir delecciones o duplicaciones, que usualmente se diagnostican mediante FISH, la cual es una prueba de citogenética molecular sencilla y de alta sensibilidad.

Existe controversia respecto a realizar esta prueba en caso de cardiopatía troncoconal aislada e incluso algunos autores sugieren llevarla a cabo únicamente si se tienen otros datos extracardíacos sugestivos del SDe122q11.2⁽⁹⁵⁾. Por otro lado, es necesario considerar los casos atípicos, en los que a pesar de presentar el fenotipo clásico del SDe122q11.2, la prueba resulta negativa para la del22q11.2 sugiriendo expresividad variable y la presencia de otras alteraciones moleculares en la región. En este sentido, la técnica MLPA ofrece una alta sensibilidad y tiene una correlación elevada con los resultados de FISH (93% según nuestro estudio), a un costo similar; pero con la posibilidad de detectar alteraciones en otras regiones fuera de la RTD en22q11.2, que pudieran esclarecer el mecanismo molecular del SDe122q11.2 y la presencia de otro tipo de patología que se sobrepone a los datos clínicos de SDe122q11.2⁽⁹⁶⁾.

Aún con las ventajas que ofrece el MLPA, hasta la fecha no se ha podido establecer una relación genotipo-fenotipo, es decir, no existe relación en el tamaño de la delección y las manifestaciones clínicas⁽⁹⁷⁾. Sin embargo, en una revisión

sistemática de deleciones típicas y atípicas, realizadas en un número elevado de pacientes, se demostró una clara relación entre el sitio de la deleción y la expresión fenotípica; así el SDe122q11.2 se asoció a la deleción de 3Mb/1.5Mb o a la haploinsuficiencia de *TBX1*⁽⁹⁸⁾; sin embargo, existe controversia, pues si bien se ha descrito un papel importante de *TBX1* en el desarrollo cardíaco, hay reportes en los que no se ha encontrado una influencia directa de las variaciones en el DNA o haplotipos de *TBX1* sobre la presencia o severidad del fenotipo cardíaco⁽⁹⁹⁾.

Por otro lado, existe evidencia de genes adicionales en la región 22q11.2 que están involucrados en el desarrollo cardíaco como *CRKL*, *HIRA* y *UFD1L*; por lo que resulta probable que dichos genes contribuyan a las CC en pacientes con deleciones atípicas que excluyen a *TBX1*⁽¹⁰⁰⁾; en este sentido, el empleo de técnicas novedosas como HRM permitió detectar variantes en el DNA principalmente en los exones 6,11,16, 17 y 26 del gen *HIRA*, en el exón 3 de *CRKL* (3B, 3CD, 3J, 3N Y 3P) y en los exones 1,5, 7/8 y 9A de *TBX1*; especialmente en pacientes con las CC más complejas como TF, TGV, TA2, AP asociada a otras alteraciones, CIA/CIV y DVSVD; de igual manera todos los casos de paladar hendido de pacientes con SDe122q11.2 en este estudio presentan variantes en el exón 3 de *CRKL*, por lo que dichas variantes tendrán que ser comprobadas mediante secuenciación.

La variabilidad del fenotipo orienta hacia genes o variantes modificadoras o factores epigenéticos que influyen durante el desarrollo para determinar la expresión de la alteración genética inicial, estudios como secuenciación del exoma completo podría ayudar a identificar genes candidatos y la secuenciación del Genoma completo⁽¹⁰¹⁾, podría ayudar a identificar variaciones comunes o raras de nucleótido único en regiones codificantes y no codificantes, así como CNVs que sirvan como modificadores⁽¹⁰²⁾. De tal manera podría explicarse que los genes candidatos o regiones y variantes reguladoras probablemente interactúan con los genes deletados en la región 22q11.2.; al respecto, se han propuesto genes como *FGF8*, *VEGF*, *2FGF10*, *PITX2*, *CHD7*, *VEFR3*, *EYA1*, *WNT5A*, *BMPER* y *Otog-MyoD* dentro de este contexto.

Las alteraciones en el número de copias de algunos genes modificadores de histonas como *JMJD1C* (*jumonji domain containing 1C*), *PREB1* (*Ras responsable element binding protein 1*), *SEC24C* (*SEC24 family member C*) también se ha relacionado con la variabilidad del fenotipo cardíaco en presencia de la del22q11.2, ya que algunos de ellos interactúan con genes en la RTD como *TBX1* y es posible que de esta manera también se vea afectada la expresión de otros genes como *CRKL*, *DGCR8* y *HIC2* entre otros⁽¹⁰³⁾.

Un modificador de *TBX1* en el contexto de la formación de los arcos faríngeos, es el ácido retinoico (AR); tanto su aplicación exógena, como la reducción de los niveles de este compuesto, alteran la expresión de *TBX1*⁽¹⁰⁴⁾, por lo que se requiere de un equilibrio de este derivado de la vitamina A, para el desarrollo adecuado de los arcos branquiales. Se ha demostrado que la disminución de AR puede contribuir a una recuperación temprana de los defectos de arcos aórticos relacionados con SDe122q11.2. Además, el AR también puede afectar las interacciones entre *TBX1* y *CRKL* y se ha observado que cuando están presentes alteraciones en ambos genes, la incidencia de malformaciones del arco aórtico es mayor y con fenotipos más severos, que cuando sólo se afecta uno de los dos genes⁽¹⁰⁵⁾.

Un número pequeño de casos de SDe122q11.2-like (similar) puede deberse a CNVs localizadas en otros cromosomas (4q,8p,10p, 17p) y pueden ser otras causas de variabilidad. Todo lo anterior podría explicar los casos de fenotipo clásico sin alteraciones citogenéticas o moleculares reconocidas en SDe122q11.2.

En este estudio una de las regiones fuera del cromosoma 22 donde se encontraron más alteraciones fue en 9q34.3 donde se localiza *EHMT1*, el cual codifica para una metiltransferasa de histona que es parte del complejo E2F6 cuya función es reprimir la transcripción; las deleciones en esta región se asocian al Síndrome Kleefstra⁽¹⁰⁶⁾ caracterizado por braquicefalia, sinofridia, labio superior en arco de cúpido, maxilar inferior prominente, hipotonía, crisis convulsivas, alteraciones de la conducta y cardiopatías que incluyen defectos septales, estenosis pulmonar, aorta bivalva y PCA; si bien el fenotipo de éste síndrome comparte algunas de las manifestaciones del SDe122q11.2, no se encontraron las dismorfias más

sugestivas reportadas en la literatura en los pacientes con deleciones o duplicaciones por lo que se podría considerar como un gen modificador mediante inactivación transcripcional por remodelación de la cromatina⁽¹⁰⁷⁾.

Contar con un diagnóstico de certeza para otorgar asesoramiento genético, valorar y atender adecuadamente los múltiples problemas que se presentan en el SDel22q11.2, prever las complicaciones futuras y detectar tempranamente los problemas psiquiátricos que resulten continúa como uno de los mayores retos en la atención de los pacientes con este síndrome. Los padres de los niños afectados tienen que ser estudiados para descartar un origen hereditario, ya que esta entidad presenta un modelo de herencia autosómico dominante, con un riesgo de recurrencia de 50%. En los casos familiares con padres sanos (en quienes se haya descartado la deleción) es de suma importancia descartar mosaicismo germinal⁽¹⁰⁸⁾.

12 CONCLUSIONES

- El 40% de los pacientes considerados como sindrómicos de acuerdo al fenotipo resultó positivo a la del22q11.2
- La cardiopatía congénita más frecuente en el SDe122q11.2 es la TF (46%), seguida de TA (9%) y Atresia/Estenosis pulmonar (6%)
- El 50% de los pacientes con TF y TA resultaron positivos a la del22q11.2, por lo que este tipo de cardiopatía debe ser indicación para realizar estudios moleculares para descartar del22q11.2
- Las técnicas de FISH y MLPA tienen una alta correlación (93%) entre ellas en este estudio.
- Las dismorfias más frecuentemente encontradas en los pacientes con SDe122q11.2 son fisuras palpebrales estrechas, hipertelorismo, epicanto, puente nasal ancho y prominente, hipoplasia de *ala nasi*, pabellones auriculares acopados, concha poco profunda, boca pequeña, comisura de los labios dirigidas hacia abajo y voz hipernasal.
- Es necesario realizar estudio molecular de la región 22q11.2 no deletada en pacientes positivos a la del22q11.2 para poder explicar los fenotipos más severos y poder establecer una relación genotipo-fenotipo.
- El mayor número de variantes en *TBX1* se observó en los exones 1,5, 7/8 y 9A; en los exones 1,11,16, 17 y 26 del gen *HIRA*, en el exón 3 de *CRKL* (3B, 3CD, 3J, 3N Y 3P) especialmente en pacientes con las CC más complejas como TF, TGV, TA2, AP asociada a otras alteraciones, CIA/CIV y DVSVD
- Todos los casos de paladar hendido de pacientes con SDe122q11.2 en este estudio presentan variantes en el exón 3 de *CRKL*.

13 PERSPECTIVAS

En los pacientes en los que se encontraron variantes mediante HRM en los diferentes genes estudiados es necesario realizar secuenciación de DNA para descartar que se trate de variantes benignas o patológicas.

Sería pertinente realizar el estudio en adultos jóvenes con cardiopatía troncoconal que acuden a la consulta externa de CC, quienes en gran parte de las ocasiones no fueron valorados por un médico genetista y no se les realizó ningún estudio de genética para descartar la Del22q11.2 en edad pediátrica, sobre todo si se encuentran en edad reproductiva, para dar a conocer riesgos de recurrencia y la posibilidad de realizar diagnóstico prenatal.

LIMITANTES

No se contó con los recursos necesarios para realizar estudios de laboratorio y gabinete complementarios (pruebas de función tiroidea, niveles de calcio, niveles de Ig's, PEV, PEATC, TAC de cráneo, USG renal, Radiografía de columna, etc.) así como valoraciones por otras especialidades (Oftalmología, Otorrinolaringología, entre otras) que permitan una caracterización completa de las manifestaciones clínicas de los pacientes y dar una atención integral.

14 BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet.* 1993;30:852–6.
2. Óskarsdóttir S, Vujic M, Fasth A. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: A population-based study in Western Sweden. *Arch Dis Child.* 2004;89(2):148–51.
3. Burn J, Takao A, Wilson D, Cross I, Momma K, Wadey R, Scambler P, JG. Conotruncal anomaly face syndrome. *J Med Genet.* 1993;30:822–4.
4. Hacıhamdioğlu B, Hacıhamdioğlu D, Delil K. 22q11 deletion syndrome: current perspective. *Appl Clin Genet.* 2015;8:123–32.
5. Shprintzen RJ. VCFS: 30yrs of study. *Dev Disabil Res Rev.* 2008;14(1):3–10.
6. Fomin ABF, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM. DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. *Clinics.* 2010;65(9):865–9.
7. Wu D, Chen Y, Xu C, Wang K, Wang H, Zheng F, et al. Characteristic Face: A Key Indicator for Direct Diagnosis of 22q11.2 Deletions in Chinese Velocardiofacial Syndrome Patients. *PLoS One.* 2013;8(1):e54404.
8. Farrera A, Villanueva M, Vizcaíno A, Medina-Bravo P, Balderrábano-Saucedo N, Rives M, et al. Ontogeny of the facial phenotypic variability in Mexican patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Head Face Med.* 2019;15(1):1–12.
9. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11 . 2 Deletion Syndrome (DiGeorge Syndrome / Velocardiofacial Syndrome). *Medicine (Baltimore).* 2011;90(1):1–18.
10. Momma K. Cardiovascular Anomalies Associated With Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome. *Am J Cardiol.* 2010;105(11):1617–24.
11. Fu CH, Leung C, Kao CH, Yeh SJ. Noncardiac DiGeorge syndrome diagnosed with multiplex ligation-dependent probe amplification: A case report. *J Formos Med Assoc.* 2012;114(8):1–5.
12. Luciana T Pagotto, John A Hawkins, Lloyd Y Tani, Heidi Pollard LLM. Management of cardiac anomalies associated with velocardiofacial syndrome. *Prog Pediatr Cardiol.* 2002;15(2):135–44.
13. Ning E, Cheung M, George SR, Costain GA, Andrade DM, Chow EWC, et al. Prevalence of hypocalcaemia and its associated features in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;81:190–6.
14. Weinzimer SA. Endocrine aspects of the 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med.* 2001;3(1):19–22.

15. Guerrero Fernández J, Labrandero De Lera C, González Casado I, Gracia Bouthelie R. Adolescente con síndrome de delección 22q11.2 y endocrinopatía múltiple. *An Pediatr*. 2011;74(5):327–31.
16. Gul KA, Øverland T, Osnes L, Baumbusch LO, Pettersen RD, Lima K, et al. Neonatal Levels of T-cell Receptor Excision Circles (TREC) in Patients with 22q11.2 Deletion Syndrome and Later Disease Features. *J Clin Immunol*. 2015;35(4):408–15.
17. Dervalvi B, Maurer K, McDonald McGinn DM, Zackai E, Meng W, Luning Prak ET, et al. B cell development in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Immunol*. 2016;163:1–9.
18. Sullivan KE. Immunologic issues in VCFS/chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Prog Pediatr Cardiol*. 2002;15(2):103–8.
19. Vásquez-Echeverri E, Sierra F, Trujillo-Vargas CM, Orrego-Arango JC, Garcés-Samudio C, Lince R. Abordaje inmunológico del síndrome por delección 22q11 . 2. *Infectio*. 2016;20(1):45–55.
20. Casteels I, Casaer P, Gewillig M, Swillen A, Devriendt K. Ocular findings in children with a microdeletion in chromosome 22q11.2. *Eur J Pediatr*. 2008;167:751–5.
21. Furniss F, Biswas AB, Gumber R, Singh N. Cognitive phenotype of velocardiofacial syndrome: A review. *Res Dev Disabil*. 2011;32(6):2206–13.
22. Tan GM, Arnone D, McIntosh AM, Ebmeier KP. Meta-analysis of magnetic resonance imaging studies in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (velocardiofacial syndrome). *Schizophr Res*. 2009;115(2–3):173–81.
23. Franconi CP, McDonald-McGinn D, Zackai EH, McNamara MA, Salmons H, Moss E, et al. IQ and hemizyosity for the Val158Met functional polymorphism of COMT in 22q11DS. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2016;171(8):1112–5.
24. Thompson CA, Karelis J, Middleton FA, Gentile K, Coman IL, Radoeva PD, et al. Associations between neurodevelopmental genes, neuroanatomy, and ultra high risk symptoms of psychosis in 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2017;174(3):295–314.
25. Ma G, Shi Y, Tang W, He Z, Huang K, Li Z, et al. An association study between the genetic polymorphisms within TBX1 and schizophrenia in the Chinese population. *Neurosci Lett*. 2007;425(3):146–50.
26. Guna A, Butcher NJ, Bassett AS. Comparative mapping of the 22q11.2 deletion region and the potential of simple model organisms. *J Neurodev Disord*. 2015;7(1):1–16.
27. Jiramongkolchai P, Kumar MS, Chinnadurai S, Wootten CT, Goudy SL. Prevalence of hearing loss in children with 22q11.2 deletion syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016;87:130–3.

28. Moraes F, Nóvoa A, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE, Mallo M. Tbx1 is required for proper neural crest migration and to stabilize spatial patterns during middle and inner ear development. *Mech Dev.* 2005;122(2):199–212.
29. Solot CB, Gerdes M, Kirschner RE, McDonald-McGinn DM, Moss E, Woodin M, et al. Communication issues in 22q11.2 deletion syndrome: Children at risk. *Genet Med.* 2001;3(1):67–71.
30. Dyce O, McDonald-McGinn D, Kirschner RE, Zackai E, Young K, Jacobs IN. Otolaryngologic Manifestations of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:1408–12.
31. Jun Liao, Vimla S. Aggarwal, Sonja Nowotschin, Alexei Bondarev, Shari Lipner BEM. Identification of downstream genetic pathways of Tbx1 in the second heart field. *Dev Biol.* 2008;316:524–37.
32. Grevellec A, Tucker AS. The pharyngeal pouches and clefts : Development , evolution, structure and derivatives. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(3):325–32.
33. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JAS, et al. 22q11.2 Deletion Syndrome. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:1–19.
34. Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* 2000;407(September):221–6.
35. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O’Hare AM, Hu P, Roe BA, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):489–501.
36. Karbarz M. Consequences of 22q11.2 microdeletion on the genome, individual and population levels. *Genes.* 2020;11(9):1–17.
37. Molck MC, Vieira TP, Sgardiolli IC, Simioni M, dos Santos AP, Souza J, et al. Atypical copy number abnormalities in 22q11.2 region: Report of three cases. *Eur J Med Genet.* 2013;56(9):515–20.
38. Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FTS, Christofolini DM, Kulikowski LD, Cernach MCSP, et al. Atypical 22q11.2 deletion in a patient with DGS/VCFS spectrum. *Eur J Med Genet.* 2008;51(3):226–30.
39. Uddin RK, Zhang Y, Siu VM, Fan Y-S, O’Reilly RL, Rao J, et al. Breakpoint Associated with a novel 2.3 Mb deletion in the VCFS region of 22q11 and the role of Alu (SINE) in recurring microdeletions. *BMC Med Genet.* 2006;7(18).
40. Cirillo E, Giardino G, Gallo V, Puliafito P, Azzari C, Bacchetta R, et al. Intergenerational and intrafamilial phenotypic variability in 22q11.2 Deletion syndrome subjects. *BMC Med Genet.* 2014;15(1):1–8.

41. Halder A, Jain M, Chaudhary I, Varma B. Chromosome 22q11.2 microdeletion in monozygotic twins with discordant phenotype and deletion size. *Mol Cytogenet.* 2012;5(13):1–8.
42. Brunet A, Armengol L, Heine D, Rosell J, García-Aragonés M, Gabau E, et al. BAC array CGH in patients with Velocardiofacial syndrome-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1. *BMC Med Genet.* 2009;10:144.
43. Van Opstal D, Boter M, Noomen P, Srebniak M, Hamers G, Galjaard R-JH. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for rapid distinction between unique sequence positive and negative marker chromosomes in prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet.* 2011;4(1):2.
44. Zhang X, Xu Y, Liu D, Geng J, Chen S, Jiang Z, et al. A modified multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of 22q11.2 copy number variations in patients with congenital heart disease. *BMC Genomics.* 2015;16(1):1–11.
45. Vautier M, Georgin-Lavialle S, Hermine O, Bienvenu B, Lacaze E, Gerard M, et al. Efficiency and good tolerance of rituximab for idiopathic thrombocytopenic purpura revealing a 22q11 deletion syndrome | Efficacité et bonne tolérance du rituximab sur un purpura thrombopénique immunologique chronique révélant un syndrome de délétion 22q1. *Rev Med Interne.* 2016;37(11):1–5.
46. Brenner MK, Clarke S, Mahnke DK, Simpson P, Bercovitz RS, Tomita-mitchell A, et al. Effect of 22q11.2 deletion on bleeding and transfusion utilization in children with congenital heart disease undergoing cardiac surgery. *Pediatr Res.* 2016;79(2):318–24.
47. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet.* 2007;370(9596):1443–52.
48. Demczuk S, Lévy A, Aubry M, Croquette MF, Philip N, Prieur M, et al. Excess of deletions of maternal origin in the DiGeorge/Velo-cardio-facial syndromes. A study of 22 new patients and review of the literature. *Hum Genet.* 1995;96(1):9–13.
49. Sandrin-Garcia P, Macedo C, Martelli LR, Ramos ES, Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A, et al. Recurrent 22q11.2 deletion in a sibship suggestive of parental germline mosaicism in velocardiofacial syndrome. *Clin Genet.* 2002;61(5):380–3.
50. Vergés L, Molina O, Geán E, Vidal F, Blanco J. Deletions and duplications of the 22q11.2 region in spermatozoa from DiGeorge/velocardiofacial fathers. *Mol Cytogenet.* 2014;7:86.
51. Vieira TP, Sgardioli IC, Gil-Da-Silva-Lopes VL. Genetics and public health: The experience of a reference center for diagnosis of 22q11.2 deletion in Brazil and suggestions for implementing genetic testing. *J Community Genet.* 2013;4(1):99–106.

52. Bretelle F, Beyer L, Christine M, Missirian C, Sigaudy S, Gamberre M, et al. European Journal of Medical Genetics Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11 . 2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet.* 2010;53(6):367–70.
53. Boudjemline Y, Fermont L, Bidois J Le, Lyonnet S, Daniel S, DAmien B. Prevalence of 22q11 deletion in fetuses with conotruncal cardiac defects : A 6-year prospective study. *J Pediatr.* 2001;138(4):520–254.
54. Beauchesne LM, Warnes CA, Connolly HM, Ammash NM, Grogan M, Jalal SM, et al. Prevalence and Clinical Manifestations of 22q11 . 2 Microdeletion in Adults With Selected Conotruncal Anomalies. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(4):595–8.
55. Lewin MB, Lindsay EA, Jurecic V, Goytia V, Towbin JA, Baldini A. A genetic etiology for interruption of the aortic arch type B. *Am J Cardiol.* 1997 Aug 15;80(4):493–7.
56. Unolt M, Versacci P, Anaclerio S, Lambiase C, Calcagni G, Trezzi M, Carotti A, Blaine T, Zackai E, Goldmuntz E, Gaynor JW, Digilio MC, McDonald-McGinn D MB. Congenital heart diseases and cardiovascular abnormalities in 22q11.2 deletion syndrome:From well-established knowledge to new frontiers. *Am J Med Genet.* 2018;176(10):2087–98.
57. Monteiro FP, Vieira TP, Sgardoli IC, Molck MC, Damiano AP, Souza J, et al. Defining new guidelines for screening the 22q11.2 deletion based on a clinical and dysmorphic evaluation of 194 individuals and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2013;172(7):927–45.
58. Khodja FA, Abdellali M. Exclusion of Chromosomal Abnormalities and Microdeletions 22q11 and 10p13 in Algerian Patients with Isolated Conotruncal. *Cytol Genet.* 2015;49(1):36–41.
59. OMIM [Internet]. Available from: <http://omim.org/entry/602054?search=tbx1&highlight=tbx1>
60. NCBI [Internet]. Available from: <http://genome.ucsc.edu>
61. Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, et al. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics.* 1997;43(3):267–77.
62. Wang H, Chen D, Ma L. Genetic analysis of the TBX1 gene promoter in ventricular septal defects. 2012;53–8.
63. Yan Y, Su M, Song Y, Tang Y, Tian X, Rood D, et al. Tbx1 modulates endodermal and mesodermal differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2014;23(13):1491–500.

64. Calmont A, Ivins S, Van Bueren KL, Papangeli I, Kyriakopoulou V, Andrews WD, et al. Tbx1 controls cardiac neural crest cell migration during arch artery development by regulating Gbx2 expression in the pharyngeal ectoderm. *Development*. 2009;136(18):3173–83.
65. Gao S, Li X, Amendt BA. Understanding the role of Tbx1 as a candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(6):613–21.
66. Liao J, Aggarwal VS, Nowotschin S, Bondarev A, Lipner S, Morrow BE. Identification of downstream genetic pathways of Tbx1 in the second heart field. *Dev Biol*. 2008;316(2):524–37.
67. Cai C-L, Liang X, Shi Y, Chu P-H, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003;5:877–89.
68. Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomeric myogenesis. *Hum Mol Genet*. 2004;13(22):2829–40.
69. Epstein J, Buck CA. Transcriptional regulation of cardiac development: Implications for congenital heart disease and DiGeorge syndrome. *Pediatr Res*. 2000;48(6):717–24.
70. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Mech Dis*. 2003;362:1366–73.
71. Roberts C, Ivins SM, James CT, Scambler PJ. Retinoic acid down-regulates Tbx1 expression in vivo and in vitro. *Dev Dyn*. 2005;232(4):928–38.
72. OMIM [Internet]. Available from: <http://www.omim.org/entry600237?search=HIRA&highlight=hira>
73. Ray-Gallet D, Ricketts MD, Sato Y, Gupta K, Boyarchuk E, Senda T, et al. Functional activity of the H3.3 histone chaperone complex HIRA requires trimerization of the HIRA subunit. *Nat Commun*. 2018;9:1–15.
74. Gal C, Moore KM, Paszkiewicz K, Kent NA, Whitehall SK. The impact of the HIRA histone chaperone upon global nucleosome architecture. *Cell Cycle*. 2015;14(1):123–34.
75. Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, Amati F, Bordoni R, Mandich P, et al. Isolation and characterization of a novel transcript embedded within HIRA, a gene deleted in DiGeorge syndrome. *Mol Genet Metab*. 1999;67(3):227–35.
76. OMIM [Internet]. Available from: <http://www.omim.org/entre/602007?search=crkl&highlight=crkl>

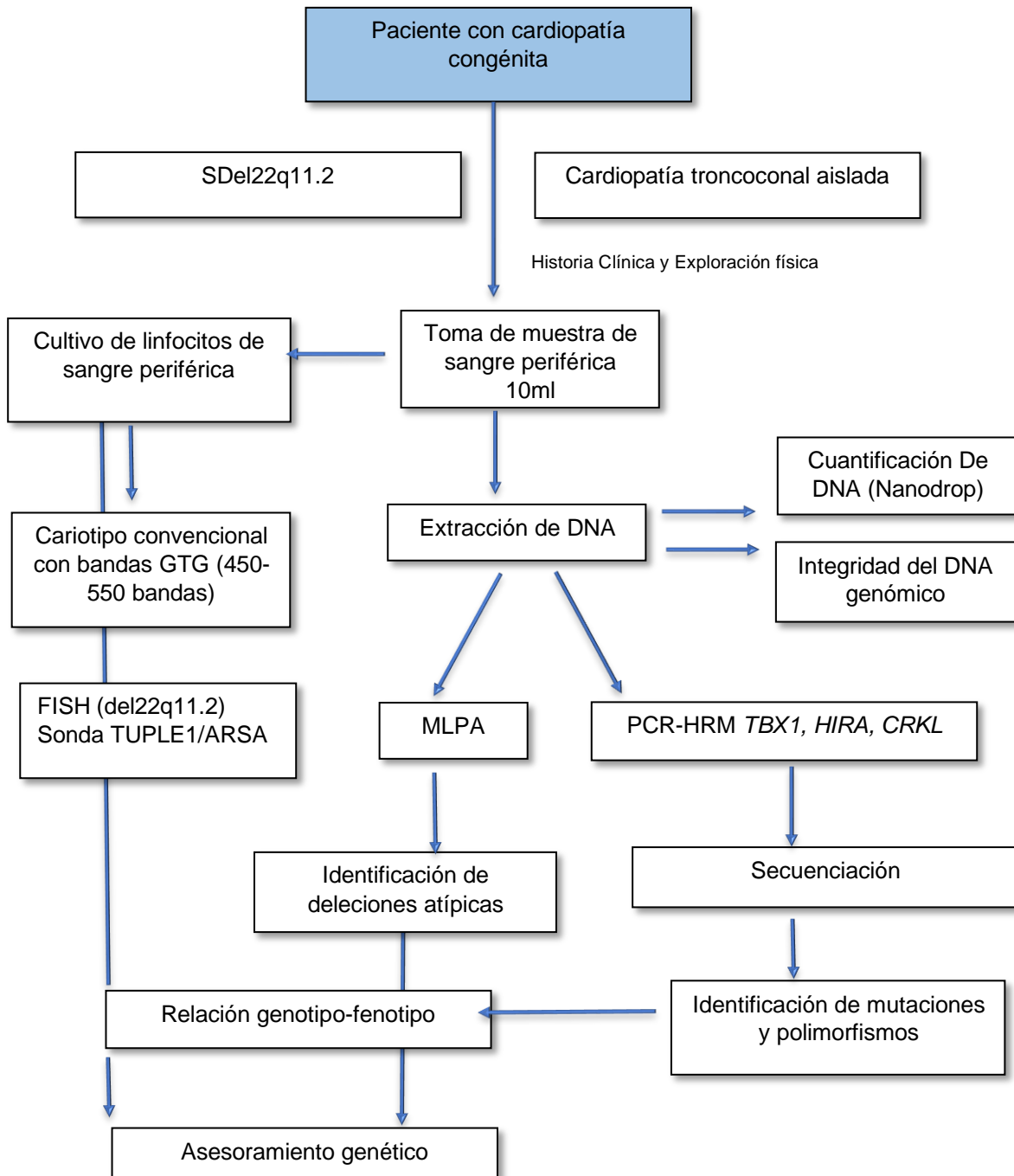
77. Miller KA, Tan TY, Welfare MF, White SM, Stark Z, Savarirayan R, et al. A mouse splice-site mutant and individuals with atypical chromosome 22q11.2 deletions demonstrate the crucial role for Crkl in craniofacial and pharyngeal development. *Mol Syndromol*. 2014;5(6):276–86.
78. Guris DL, Duester G, Papaioannou VE, Imamoto A. Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome. *Dev Cell*. 2006;10(1):81–92.
79. Moon AM, Guris DL, Seo JH, Li L, Hammond J, Talbot A, et al. Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Dev Cell*. 2006;10(1):71–80.
80. Morrow BE, McDonald-McGinn D, Emanuel BS, Vermeesch JR SP. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet*. 2018;176(10):2070–81.
81. Stoller JZ, Epstein JA. Identification of a novel nuclear localization signal in Tbx1 that is deleted in DiGeorge syndrome patients harboring the 1223delC mutation. *Hum Mol Genet*. 2005;14(7):885–92.
82. Anilkumar A, Kappanayil M, Nampoothiri S, Thampi MV, Vasudevan DM, Kumar RK. Screening for TBX1 Gene in Children With or Without Microdeletion of Chromosome 22q11 and Conotruncal Defect. *Lab Med*. 2012;43(2):11–3.
83. Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, et al. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet*. 2005;68(4):373–8.
84. Sørensen KM, Agergaard P, Olesen C, Andersen PS, Larsen LA, Ostergaard JR, et al. Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *J Mol Diagnostics*. 2010;12(2):147–51.
85. Huber J, Peres VC, de Castro AL, dos Santos TJ, da Fontoura Beltrão L, de Baumont AC, et al. Molecular Screening for 22q11.2 Deletion Syndrome in Patients With Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol*. 2014;35:1356–62.
86. Sgardioli I, Vieira T, Simioni M, Monteiro F, Gil-da-Silva-Lopes V. 22q11.2 Deletion Syndrome: Laboratory Diagnosis and TBX1 and FGF8 Mutation Screening. *J Pediatr Genet*. 2015;04(01):017–22.
87. Afenjar A, Moutard ML, Doummar D, Guët A, Rabier D, Vermersch AI, et al. Early neurological phenotype in 4 children with biallelic PRODH mutations. *Brain Dev*. 2007;29(9):547–52.
88. Chen WJ, Dong WJ, Lin XZ, Lin MT, Murong SX, Wu ZY, et al. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using High Resolution Melting Analysis. *BMC Med Genet*. 2009;4:4–7.

89. Michaelovsky E, Frisch A, Carmel M, Patya M, Zarchi O, Green T, et al. Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. *BMC Med Genet* [Internet]. 2012;13(122):1–11. Available from: BMC Medical Genetics
90. Mendieta-Alcántara GG, Santiago-Alcántara E, Mendieta-Zerón H, Dorantes-Piña R, de Zárate-Alarcón GO, Otero-Ojeda GA. Incidencia de las cardiopatías congénitas y los factores asociados a la letalidad en niños nacidos en dos hospitales del estado de México. *Gac Med Mex*. 2013;149(6):617–23.
91. Cantón SBF, Trujillo GG, Uribe RV. Bol Med Hosp Infant Mex Principales causas de mortalidad infantil en México: tendencias recientes estadísticas vitales. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2012;69(2):144–8.
92. Reamon-Buettner SM, Spanel-Borowski K, Borlak J. Bridging the gap between anatomy and molecular genetics for an improved understanding of congenital heart disease. *Ann Anat*. 2006;188(3):213–20.
93. Fokstuen S, Vrticka K, Riegel M, Da Silva V, Baumer A, Schinzel A. Velofacial hypoplasia (Sedlackova syndrome): A variant of velocardiofacial (Shprintzen) syndrome and part of the phenotypical spectrum of del 22q11.2. *Eur J Pediatr*. 2001;160(1):54–7.
94. Marino B, Digilio MC, Persiani M, Di Donato R, Toscano A, Giannotti A, et al. Deletion 22q11 in patients with interrupted aortic arch. *Am J Cardiol*. 1999;84(3):360–1.
95. Halder A, Jain M, Chaudhary I, Kabra M. Prevalence of 22q11.2 microdeletion in 146 patients with cardiac malformation in a referral hospital of North India. *BMC Med Genet*. 2010;11(1).
96. Jalali GR, Vorstman JAS, Errami A, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, et al. NIH Public Access. 2009;29(3):433–40.
97. Campbell IM, Sheppard SE, Crowley TB, McGinn DE, Bailey A, McGinn MJ, et al. What is new with 22q? An update from the 22q and You Center at the Children’s Hospital of Philadelphia. *Am J Med Genet Part A*. 2018;176(10):2058–69.
98. Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, et al. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet*. 2005;42(11):871–6.
99. Guo T, Mcdonald-Mcginn D, Blonska A, Shanske A, Bassett AS, Chow E, et al. Genotype and cardiovascular phenotype correlations with TBX1 in 1,022 velo-cardio-facial/digeorge/22q11.2 deletion syndrome patients. *Hum Mutat*. 2011;32(11):1278–89.
100. Thorsson T, Sow S, Levine J, Russell W, El-Kashlam N, Innis J, et al. Chromosomal Rearrangements in Patients With Congenital Cardiac Defects: a Meta-Analysis Reveals Novel Potential Critical Regions Involved in Heart Development. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(10):E524.

101. Guo T, Repetto GM, McDonald McGinn DM, Chung JH, Nomaru H, Campbell CL, et al. Genome-Wide Association Study to Find Modifiers for Tetralogy of Fallot in the 22q11.2 Deletion Syndrome Identifies Variants in the GPR98 Locus on 5q14.3. *Circ Cardiovasc Genet.* 2017;10(5):1–10.
102. Motahari Z, Moody SA, Maynard TM, Lamantia AS. In the line-up: Deleted genes associated with DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome: Are they all suspects? *J Neurodev Disord.* 2019;11(1):1–28.
103. Guo T, Chung JH, Wang T, McDonald-McGinn DM, Kates WR, Hawuła W, et al. Histone Modifier Genes Alter Conotruncal Heart Phenotypes in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2015;97(6):869–77.
104. KE Y. DiGeorge syndrome, Tbx1, and retinoic acid signaling come full circle. *Circ Res.* 2010;104(4):630–2.
105. Torres-Juan L, Rosell J, Morla M, Vidal-Pou C, García-Algas F, de la Fuente MA, et al. Mutations in TBX1 genocopy the 22q11.2 deletion and duplication syndromes: A new susceptibility factor for mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(6):658–63.
106. Kleefstra T, Van Zelst-Stams WA, Nillesen WM, Cormier-Daire V, Houge G, Foulds N, et al. Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet.* 2009;46(9):598–606.
107. Schwaibold EMC, Smogavec M, Hobbiebrunken E, Winter L, Zoll B, Burfeind P, et al. Intragenic duplication of EHMT1 gene results in Kleefstra syndrome. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):1–5.
108. Hatchwell E, Long F, Wilde J, Crolla J, Temple K. Molecular confirmation of germ line mosaicism for a submicroscopic deletion of chromosome 22q11. *Am J Med Genet.* 1998;78(2):103–6.
109. Moorhead JF, Connolly JJ, William SND. Factors affecting the reactivity of human lymphocytes in vitro. *J Immunol.* 1967;99(2):413–9.

15 ANEXOS

ANEXO 1. DIAGRAMA DE FLUJO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL



ANEXO 2. CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre periférica obtenidas de los pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” y del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se sometieron a cultivo y cosecha de linfocitos según la técnica de Arakaki y Sparkes, así como la técnica de Moorhead y cols⁽¹⁰⁹⁾. Respectivamente con ciertas modificaciones.

- **Toma de muestra:** se utilizó material estéril y desechable para obtener la muestra sanguínea por punción venosa. La cantidad mínima de muestra de 2.5ml y el procesamiento de la misma se realizó dentro de un lapso no mayor de 2hrs. En caso de cateterismo del paciente, se obtuvo la muestra durante dicho procedimiento.
- **Procesamiento de la muestra:** dentro de una campana de flujo laminar se colocó el material no biológico necesario para la siembra de muestras y se irradió con luz UV durante 15 minutos. Cada muestra se trabajó por duplicado. A cada tubo estéril de 15 ml se le asignó el número de caso correspondiente y se adicionó lo siguiente:
 - 100 μ l de fitohematoglutinina (Gibco, cat.10576-015)
 - 5 ml de medio de cultivo (McCoy’s 5^a Medium Modified, Gibco cat. 12330-031)
 - 600 μ l de Suero fetal bovino
 - 40 μ l de antibiótico (Ampicillin Sodium Salt-Irradiated, Gibco cat. 11593-027)
 - 750 μ l de muestra sanguínea previamente homogenizada por inversión o agitación moderada

Se colocaron los tubos de cultivo en la incubadora por 72hrs a 37°C. Al término de la incubación, se homogenizó el contenido de cada tubo. Posteriormente se adicionó a cada uno 60 μ l de colchicina (10 μ g/ml; KaryoMAX COLCEMID Gibco, cat.15210-040) y se colocaron nuevamente en la estufa durante 25 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, se centrifugaron a 1500rpm durante 6 minutos. Terminada la centrifugación se extrajo el sobrenadante con una pipeta pasteur, sin tocar el botón.

Se adicionaron lentamente 5ml de solución hipotónica de KCL 0.075 M (37°C), se pipeteó constantemente o se agitó en vórtex y se adicionó solución hipotónica aforando hasta 10ml. Posteriormente se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, se adicionó 1ml de solución fijadora (Ac. Acético al 5% en Metanol 1:3), se homogenizó por inversión y se centrifugó a 1500rpm por 6 minutos.

- **Lavado de la muestra:** se desechó el sobrenadante utilizando la pipeta, sin tocar el botón; posteriormente se adicionó lentamente solución fijadora (en refrigeración) hasta 7ml, se homogenizó el botón y se centrifugó a 1500rpm durante 6 minutos. Terminando la centrifugación se desechó el sobrenadante con la pipeta sin tocar el botón y se adicionó la solución fijadora hasta 10ml y se centrifugó a 1500rpm por 10 minutos. Se realizaron de 3 a 4 lavados, dependiente de los restos de membranas y hemoglobina que contuviera la muestra.

- **Elaboración de laminillas:** Una vez que se concluyó con los lavados, se dejó la muestra en un volumen final de 0.5ml, se homogenizó para realizar el goteo de laminillas; las cuales previamente se lavaron con jabón (Merck, Germany), se enjuagaron y se colocaron en un frasco con Etanol (Merck, Germany) al 100% manteniéndolas en refrigeración al menos por 24 horas. Las laminillas se sacaron, escurrieron y pulieron con un lienzo de algodón limpio y seco, posteriormente se colocaron en un recipiente de agua destilada helada (40ml y 3ml de metanol) y se mantuvieron en congelación durante 15 minutos. Se tomó una laminilla con una pinza y se dejaron caer sobre ella 40 µl de la muestra, posteriormente se colocó la laminilla en una platina a 32-35°C durante 3 minutos y se signó el número de muestra, después fue observada en el microscopio para valorar el crecimiento y la calidad del material.

ANEXO 3. TÉCNICA DE BANDAS GTG PARA CARIOTIPO

Una vez que se corroboró el crecimiento, se elaboraron 4 laminillas más, las cuales fueron debidamente marcadas y deshidratadas en una estufa a 45-60°C por lo menos durante 24 horas. Posteriormente una vez que las laminillas estaban deshidratadas (maduras) se utilizó la técnica de bandas GTG (Giemsa-Tripsina-Giemsa) de Seabright (1971) con algunas modificaciones.

En un vaso de Koplín con 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos (Fosfato de Sodio 0.025M y fosfato de Potasio 0.025M, pH 6.8) colocado a baño María a 37°C se adicionaron 75 ml de tripsina-EDTA y se introdujeron las laminillas una por una durante un tiempo aproximado de 1.15 segundos (para establecer el tiempo óptimo para la digestión enzimática sobre los cromosomas), posteriormente se colocaron en un vaso de Koplín con solución salina durante 15 segundos, después se tiñeron en un vaso de Koplín con colorante Wright durante 6 segundos y se contratiñeron en un vaso de Koplín con colorante Giemsa durante 2 minutos 20 segundos, se enjuagaron en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente se revisó la calidad del bandeo de cada laminilla, con el objetivo 100x en el microscopio.

ANEXO 4. FISH (HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU)

Las laminillas montadas con la técnica descrita previamente fueron sometidas a:

- **Desnaturalización:** se colocó la sonda en la zona a hibridar y se colocó un cubreobjetos de 18 x 18cm, posteriormente se selló con cemento Iris y se colocó en una platina a $73^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, después se depositaron las laminillas en una cámara de hibridación por 24 horas a 37°C en la oscuridad.
- **Lavados:** pasado el tiempo de hibridación se retiró el sello del cemento y se colocó la laminilla en un vaso de Koplín con 2xSSC (Solución Salina Sodio Citrato) para retirar el cubreobjetos sin dañar el material. Posteriormente se colocó la laminilla en un vaso de Koplín con 0.4 2xSSC/0.3% NP40 a baño María de $73^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, después se pasó la laminilla a un vaso de Koplín con 2xSSC/0.1% NP40 a temperatura ambiente durante 3 minutos y finalmente se lavó en agua destilada durante 1 minuto.
- **Contratinción:** se agregaron 5 ml de la contratinción DAPI 1:1 Antifade y se esperó un tiempo de 10 minutos, posteriormente se observó al microscopio de Luz

ANEXO 5. EXTRACCIÓN DE DNA (PARA KIT GENTRA PUREGENE, Qiagen ®)

Se colectó una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica de cada paciente en tubos con EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer Ref. 367863) y se centrifugó la muestra sanguínea a 3,500 rpm durante 20 minutos.

Posteriormente se agregó en un tubo para microcentrífuga de 1.5ml, 900µl de solución RBC Lysis Solution y se adicionó por medio de una pipeta pasteur aproximadamente 300µl de paquete celular, la mezcla se invirtió 10 veces, se incubó por 1 minuto e inmediatamente después se puso en Rotator durante 7 minutos.

Después de agitar vigorosamente, se centrifugó a 15000 x g (RFC) por 30 segundos y se descartó el sobrenadante de la solución RBC Lysis Solution dejando aproximadamente 10 µl de líquido residual y el paquete de glóbulos blancos, el cual se agitó nuevamente de forma vigorosa hasta disgregar completamente el botón.

Se añadieron 300 µl de la solución Cell Lysis Solution y se agitó vigorosamente durante 30 segundos para homogenizar, se dejó incubar la mezcla a 55°C por 5 minutos y se volvió a agitar. Posteriormente se refrigeró la muestra en congelador o bien en hielo frappe durante 8 minutos (en este paso se puede congelar hasta por 12 semanas para posteriormente seguir con el proceso).

Se adicionó 100 µl de la solución Protein Precipitation Solution a la muestra y se agitó vigorosamente en vórtex durante 30 segundos. Se centrifugó a 16000 x g (RFC) por 3 minutos (el precipitado debía de ser café marrón y si aún no precipitaba se congelaba por 10 minutos más y se repetía la centrifugación). El sobrenadante debía ser claro.

En un tubo para microcentrífuga de 1.5ml se añadieron 300 µl de isopropanol y se adicionó el sobrenadante del paso anterior. Se mezcló e invirtió suavemente aproximadamente 40 veces y se centrifugó a 15000 x g durante 1 minuto.

Para lavar el paquete de DNA se descartó el sobrenadante y se adicionó 300 µl de etOH al 70%, se invirtió vigorosamente hasta desprender el botón del fondo.

Se centrifugó a 16000 x g durante 1 minuto y se descartó cuidadosamente el sobrenadante, cuidando que el botón permaneciera en el tubo, el cual se drenó en un papel absorbente limpio asegurando la presencia del botón de DNA y se dejó secando hasta la evaporación total del etanol y se resuspendió en 100ml de Solución DNA Hydration Solution.

Por último, se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Se cuantificó la concentración de impurezas y se consideró como criterio de pureza el cociente D_{0260}/D_{0280} mayor o igual a 1.6 y menor de 2.0.

Se verificó la integridad de DNA extraído en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio (5mdml). La electroforesis se corrió a 100 volts por 20 minutos y se observó en un transiluminador con luz ultravioleta.

ANEXO 6. MLPA (Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligamiento)

- **Desnaturalización:** se etiquetaron tubos de 0.2ml, posteriormente se agregaron 5 μ l de muestra (50-250 ng) a cada tubo, a excepción del control (TE o agua estéril). Se colocaron los tubos en el termociclador y se inició el programa de MLPA: desnaturalización de la muestra por 5 minutos a 98°C y después se enfriaron a 25°C.
- **Hibridación:** se mezcló el buffer de MLPA y el mix de sondas de MLPA antes de su uso, posteriormente se preparó el master mix de hibridación el cual contiene para cada reacción: 1.5 μ l de buffer MLPA y 1.5 μ l de mix de sondas. Se homogenizó la mezcla mediante agitación vigorosa en vórtex o pipeteo y después de la desnaturalización del DNA se agregaron 3 μ l del mix de hibridación a cada tubo de muestras, pipeteando para mezclar homogéneamente. Se continuó el programa del termociclador: incubación durante 1 minuto a 95°C y después por 16 a 20 horas a 60°C.
- **Ligación:** se agitaron vigorosamente los buffers de ligación antes de su uso y se preparó el master mix Ligasa-65. Para cada reacción se agregaron 25 μ l de dH_2O + 3 μ l de buffer de Ligasa A + 3 μ l de buffer de Ligasa B. Posteriormente se agregó 1ml de enzima Ligasa-65, se mezcló por pipeteo.

El termociclador se pausó a los 54°C, una vez alcanzada esta temperatura se agregaron 32 μ l de master mix ligasa a cada tubo de reacción y se pipeteó para homogenizar. Posteriormente se continuó el programada del termociclador: 15 minutos de incubación a 54°C (ligación), seguido de 5 minutos a 98°C para inactivación por calor de la Ligasa-65 y se pausó el programa a 20°C. En este punto los tubos fueron removidos del termociclador.

- **PCR:** se agitó vigorosamente el primer mix SALSA PCR antes de su uso, mientras se calentaba la polimerasa por 10 segundos para reducir la viscosidad, posteriormente se preparó el master mix de polimerasa agregando para cada reacción: 7.5 μ l de dH_2O + 2 μ l de primer mix SALSA PCR + 0.5 μ l de Polimerasa SALSA, se pipeteó para homogenizar y se mantuvo en hielo hasta su uso.

A temperatura ambiente se agregaron 10 μ l de mix polimerasa a cada tubo, mezclando por pipeteo y se continuó el programa del termociclador: 35 ciclos: 30

segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C. Se terminó el programa con 20 minutos de incubación a 72°C y se pausó a los 15°C.

Después de la reacción de PCR se colocó la muestra en una placa con LIZ GS500 y formamida y se almacenó en una caja oscura o envuelta en papel aluminio hasta su procesamiento en el secuenciador.

Los resultados se analizaron con Software de Coffalyser (Figura 16)

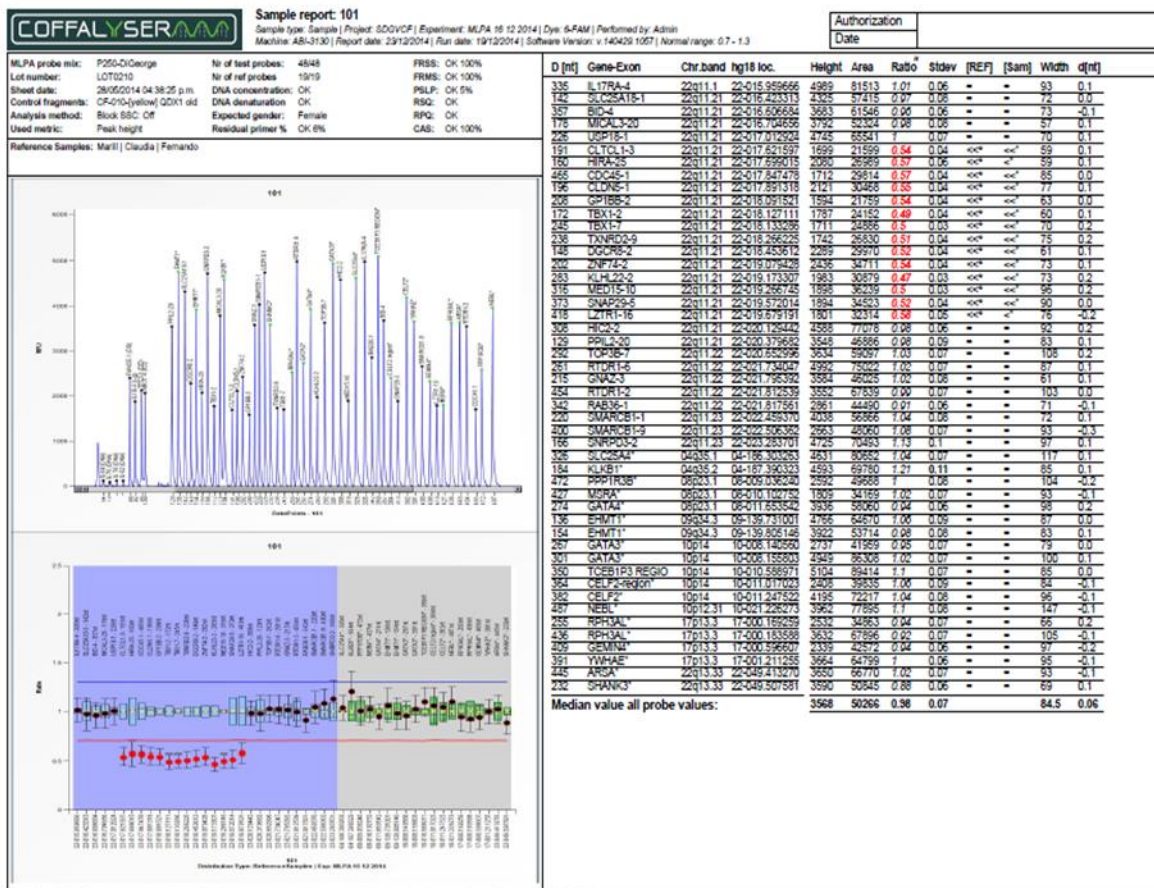


Figura 16. Software Coffalyser MLPA

Se muestra el software de Coffalyser para MLPA a la izquierda una imagen de la delección y a la derecha los ratios (ratio) de la delección en números rojos.

ANEXO 7. HIGH RESOLUTION MELTING (THERMO FISHER SCI. APPLIED BYOSYSTEMS™)

1. Se añadieron los volúmenes requeridos de cada componente en un tubo de tamaño apropiado según el número de muestras a estudiar, se mezcló y centrifugó brevemente.

TABLA 12. COMPONENTES PARA REACCIÓN HRM		
Componente	Volumen por reacción	Concentración final
MeltDoctor™ HRM Master Mix 2X	10 µl	1x
Primer F(mM)	1.2 µl	0.3mM
Primer R (mM)	1.2 µl	0.3mM
DNA genómico (20ng/µl)	1.0 µl	1 ng/µl
H ₂ O	6.6µl	-
Volumen Total	20 µl	

2. **Preparación de la placa de reacción:** se añadieron 19 µl del Mix a cada pozo previamente cargado con 1 µl de DNA genómico de cada paciente, posteriormente se selló la placa de reacción con un film adhesivo y se centrifugó brevemente. Se confirmó que el líquido se encontrara en el fondo de los pozos en la placa de reacción, y se colocó la placa en hielo, protegida de la luz hasta que se iniciara la corrida en el termociclador.

3. **Corrida de la placa de reacción:** en el termociclador Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System en modo estándar con volumen total de 20 μ l se guardaron las siguientes condiciones

TABLA 13. CONDICIONES HRM				
Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ramp Rate
Holding	Activación de la enzima	95°C	10 min	100%
Ciclos (40)	Desnaturalización	95°C	15 seg	100%
	Alineamiento/extensión	60°C	1 min	100%
Curva Melt/disociación	Desnaturalización	95°C	10 seg	100%
	Alineamiento	60°C	1 min	100%
	High resolution melting	95°C	15seg	1%
	Alineamiento	60°C	15 seg	100%

TABLA 14. VARIACIONES DE T _m PARA LOS DIFERENTES EXONES						
GEN/EXON	58°C	60°C		61°C	63°C	65°C
CRKL	<i>CRKL3B</i> <i>CRKL3S</i>	<i>CRKL2A</i>	<i>CRKL2B</i>	<i>CRKL1A</i> <i>CRKL1B</i> <i>CRKL 3CD</i>	<i>CRKL 1C</i> <i>CRKL 1D</i> <i>CRKL 3T</i>	
		<i>CRKL 3A</i>	<i>CRKL 3E</i>			
		<i>CRKL 3F</i>	<i>CRKL 3G</i>			
		<i>CRKL 3H</i>	<i>CRKL 3J</i>			
		<i>CRKL 3K</i>	<i>CRKL 3M</i>			
		<i>CRKL 3N</i>	<i>CRKL 3P</i>			
		<i>CRKL 3Q</i>				
HIRA	<i>HIRA 24</i>	<i>HIRA A</i>	<i>HIRA 2</i>	<i>HIRA 16</i>		<i>HIRA 8</i> <i>HIRA 9</i> <i>HIRA 11</i> <i>HIRA 20</i> <i>HIRA 25</i>
		<i>HIRA 3</i>	<i>HIRA 4</i>			
		<i>HIRA 5</i>	<i>HIRA 6</i>			
		<i>HIRA 7</i>	<i>HIRA 13</i>			
		<i>HIRA 14</i>	<i>HIRA 15</i>			
		<i>HIRA 17</i>	<i>HIRA 18</i>			
		<i>HIRA 19</i>	<i>HIRA 21</i>			
		<i>HIRA 22</i>	<i>HIRA 23</i>			
		<i>HIRA 26</i>	<i>HIRA 27</i>			
TBX1		<i>TBX1-1</i>	<i>TBX1-4</i>		<i>TBX1- 9D</i>	<i>TBX1-2</i> <i>TBX1-6</i>
		<i>TBX1-5</i>	<i>TBX1-7/8</i>			
		<i>TBX1-9C</i>				

4. Se guardó el archivo y con el Software de Applied Biosystems High Resolution Melt v2.0.2 se analizaron las curvas melt (Figura 17).

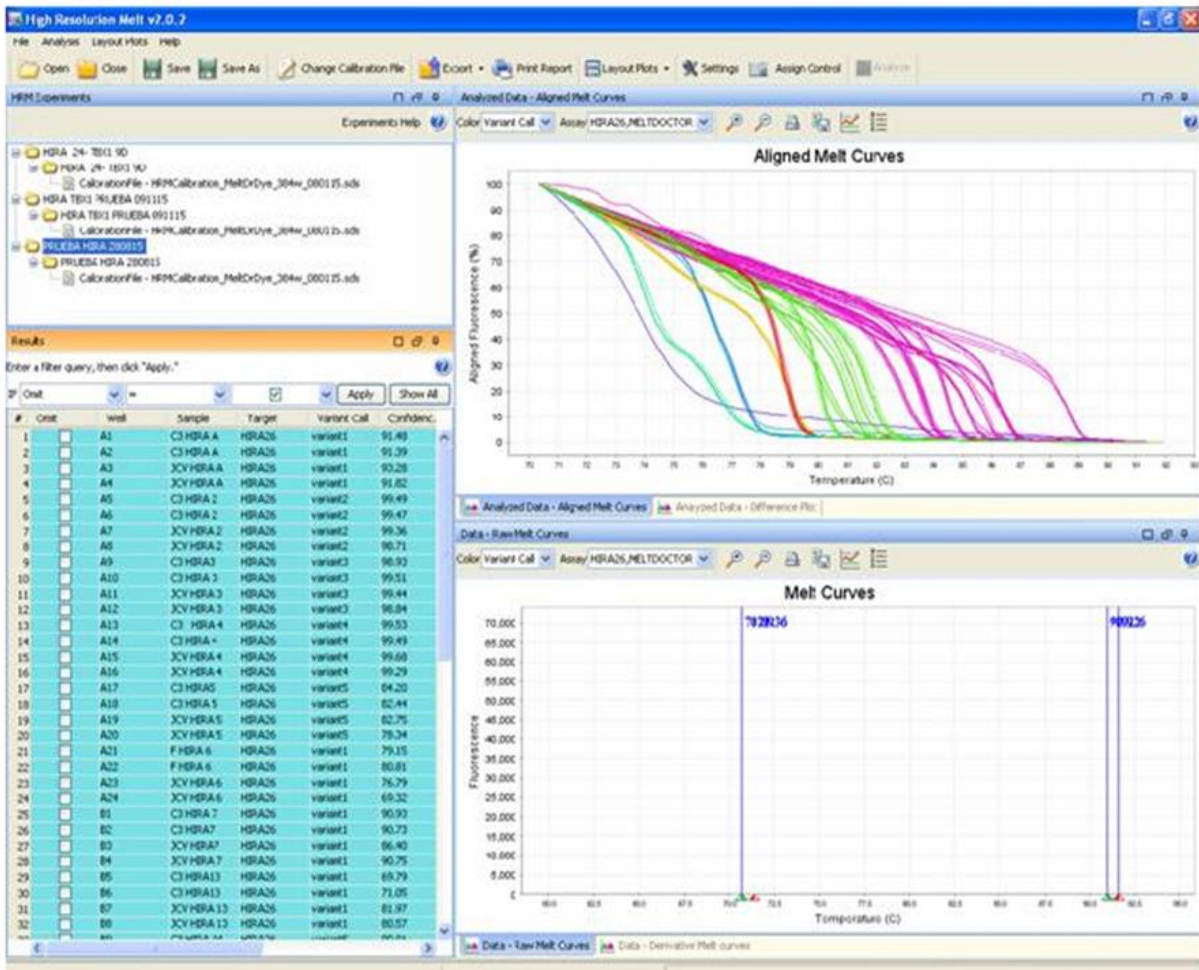


Figura 17. Software de Applied Biosystems HRM

Estandarización de diferentes exones del gen HIRA mostrando las diferentes curvas de melting.

ANEXO 8. DISEÑO DE PRIMERS

Para el diseño de los oligonucleótidos, se realizó la búsqueda de secuencias de cada gene en el GenBank del National Center for Biotechnology Information. Eligiendo la secuencia completa de nucleótidos del gen *HIRA* (Gene ID 7290), *CRKL* (Gene ID 1399) y *TBX1* (Gene ID 6899).

El análisis de las secuencias para el diseño de los oligonucleótidos se realizó con el software Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ya que dicho software permite calcular y controlar ciertos parámetros de los oligonucleótidos como el tamaño del producto amplificado, delta G de estabilidad interna de cada oligonucleótido, contenido de guaninas y citocinas, temperatura de alineación (T_m), formación de estructuras secundarias, falso apareamiento de cada oligonucleótido (false priming), entre otros.

Posteriormente se verificó el alineamiento los oligonucleótidos con información de la base de datos NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con el fin de verificar especificidad.

8.1 DISEÑO DE PRIMERS PARA GEN CRKL

EXON	SECUENCIA	PB	TM	% GC	AMP
CRKL 1A-F	TGATTGGCTGCGCTGTGTGACGTAA	25	67.3	52.00	213pb
CRKL 1A-R	GTCACACGAGGCACCGAACTCGAA	23	67.0	60.87	
CRKL 1B-F	TTCGAGTTCGGTGCCTCGTCTGAC	24	66.62	58.33	273pb
CRKL 1B-R	CAGCACTTTCCTCTCCGCTCCGG	23	67.27	65.22	
CRKL 1C-F	CCGGAGCCGAGAGGAAAGTGCTG	23	67.27	65.22	280pb
CRKL 1C-R	AATCGCGGACGAGGAACATACCGT	24	66.28	54.17	
CRKL1D-F	ACGGTATCTTCCCTCGTCCGCGATT	24	65.83	54.17	225pb
CRKL 1D-R	CTCTCGCGTACCTGGGCGCA	20	67.04	70.00	
CRKL 2A-F	AAGGTATCCAAGCCCACCAATGG	23	62.80	52.17	244 pb
CRKL 2A-R	GGATCTCACAAGCTTTTCGACATA	24	59.13	41.67	
CRKL 2B-F	TATGTCGAAAAGCTTGTGAGATCC	24	59.13	41.67	260pb
CRKL 2B-R	ACAGATTTTACCTCTAATGCCAAGG	25	59.11	40.00	
CRKL 3A-F	TCCATACAGGTTGGTGACATCGT	23	61.64	47.83	268 pb
CRKL 3A-R	AGTCTGCAGAAAGCTGGACTTC	22	60.55	50.00	
CRKL 3B-F	CGAAGTCCAGCTTTCTGCAGACTG	24	63.89	54.17	250pb
CRKL 3B-R	CAAGCTTTCTCTGGTCAACACAACA	25	62.11	44.00	
CRKL 3CD-F	TGTTGTGTTACCAGAGAAAAGCTTG	25	62.11	44.00	566pb
CRKL 3CD-R	ACCTGTTTAGAACACACAAGTCTAG	25	58.72	40.00	
CRKL 3E-F	CTAGACTTGTGTGTTCTAACAGGT	25	58.72	40.00	222pb
CRKL 3E-R	ATGGCACACCACAACCTGCATTATT	24	61.84	41.67	
CRKL 3F-F	AATAATGCAGTTGTGGTGTGCCAT	24	61.84	41.67	237pb
CRKL 3F-R	AACGATTCTATGAACAACGCCACTT	25	61.54	40.00	
CRKL 3H-F	GTGACTAGGGAGACCATTAAGTAGT	25	59.11	44.00	302pb
CRKL 3H-R	ACAGTCACAGCAGATGATCAGTAAA	25	60.28	40.00	
CRKL 3J-F	TTTACTGATCATCTGCTGTGACTGT	25	60.28	40.00	258pb
CRKL 3J-R	GGCTAATCTCCAAGGCTTTTAGAGG	25	61.21	48.00	
CRKL 3K-F	CCTCTAAAAGCCTTGGAGATTAGCC	25	61.21	48.00	288pb
CRKL 3K-R	TCCTTGAACAAGGCACACATTCCCT	24	62.76	45.83	
CRKL 3L-F	GGAATGTGTGCCTTGTTC AAGGA	23	61.56	47.83	229pb
CRKL 3L-R	ACCAAACCACAGGTATACTCTAGG	24	59.28	45.83	
CRKL 3M-F	CCTAGAGTATACCTGTGGTTTTGGT	24	59.28	45.83	301pb
CRKL 3M-R	TGCTCTATGGAGCACAACAGTCTT	24	60.74	45.83	
CRKL 3N-F	AAGACTGTTGTGCTCCATAGAGCA	24	62.08	45.83	264pb
CRKL 3N-R	TCCTCGTTAACCATGTCATCAGGTC	25	62.36	48.00	
CRKL 3P-F	CACCTGATGACATGGTTAACGAGGA	25	62.59	48.00	238pb
CRKL 3P-R	CTCTGAGCAAACATCACAAGAGCAG	25	62.31	48.00	
CRKL 3Q-F	TGATCTTGTGATGTTTGCTCAGAG	24	61.57	45.38	242pb
CRKL 3Q-R	ACAGCAGTTACTAGGGGCATAGT	23	60.89	57.83	
CRKL 3S-F	ACTATGCCCTAGTAACTGCTGT	23	60.89	47.83	244pb
CRKL 3S-R	TGCTTACACAGAAAATATTATTGCC	25	56.47	32.00	
CRKL 3T-F	ACTTAAAGATCATAACTTCAGGC	24	55.19	33.33	306pb
CRKL 3T-R	GGACTCTGAGGAGACACTGAAAC	23	60.31	52.17	

8.2 DISEÑO DE PRIMERS PARA GEN *HIRA*

EXON	SECUENCIA	PB	TM	% GC	AMP
<i>HIRA 1F</i>	ATTTGGCAGGTGCGCGCCGTGACTT	25	71.3	60.00	338pb
<i>HIRA 1R</i>	CTGCGCGCACTCACCATTGTGGT	23	68.43	60.7	
<i>HIRA AF</i>	GAAACTGTTCATCCTGAGTTACCC	24	59.30	45.83	208pb
<i>HIRA AR</i>	CCTCAGCTTTCTTACCTGTTTTAGC	25	60.11	44.00	
<i>HIRA 2F</i>	TCTGATGTTTGGAGAATCTTCTAGC	25	58.66	40.00	183pb
<i>HIRA 2R</i>	ATACCTTGTCCTCCAGTTGCGAA	23	61.89	47.83	
<i>HIRA 3F</i>	TTGCACATTCAGCCATTTCTGCTC	24	62.64	45.83	164pb
<i>HIRA 3R</i>	AGGGCCACTCTGTAATACCTAAG	24	60.57	45.83	
<i>HIRA 4F</i>	GCATGACTACTGGATTTTCATCAC	24	58.19	41.67	155pb
<i>HIRA 4R</i>	AAAGGAAAATGATGCTTACGTAGCC	25	60.16	40.00	
<i>HIRA 5F</i>	CTTTCTCACACAGGTACATCGG	22	58.75	50.00	116pb
<i>HIRA 5R</i>	CCACTCACCGCCTGAATGAT	20	60.11	55.00	
<i>HIRA 6F</i>	CTTTCAGATGTGATGGATGTAGCAT	25	59.24	40.00	138pb
<i>HIRA 6R</i>	TGCTTGCTGTTAACCAGTCAGAG	23	61.05	47.83	
<i>HIRA 7F</i>	CTTCACAGAAATTCTAGCTACTCTG	25	57.25	40.00	175pb
<i>HIRA 7R</i>	ACTTACCTCATCAAAGGCTTGG	23	58.92	43.48	
<i>HIRA 8F</i>	AGTGTGGAGGAACGACCCATGT	22	63.61	54.55	176pb
<i>HIRA 8R</i>	ACTCACCACGACAGTCACAGCT	22	63.81	54.55	
<i>HIRA 9F</i>	GGACATGCCTGATGCTTGATTAAT	24	59.72	41.67	191pb
<i>HIRA 9R</i>	AAAAGCTCAGGATAGCAGGCTCA	23	61.96	47.83	
<i>HIRA 10F</i>	CATTAACCTTGACTGTGTCTTTCC	24	58.00	41.67	110pb
<i>HIRA 10R</i>	CCACCTTACCAGGAAATATCCATG	24	58.93	45.83	
<i>HIRA 11F</i>	CTGATGGCCATGTCTTTCAGGAC	23	61.49	52.17	143pb
<i>HIRA 11R</i>	AAGAGCCGTCAGCCTACCTTCT	22	63.14	54.55	
<i>HIRA 12F</i>	TTCCCCAGAGCCGCATTACAC	20	62.80	60.00	231pb
<i>HIRA 12R</i>	CTCTCACCTTCCCTGATATCTTCAAG	25	58.49	44.00	
<i>HIRA 13F</i>	TATGTAACTCTGCTTTGCCAGAATC	25	59.41	40.00	122pb
<i>HIRA 13R</i>	GGAATGAACCAGTACCCAGTGTC	23	60.87	60.87	
<i>HIRA 14F</i>	TACTTGATGACAGGGACTTCTCCA	24	60.76	45.83	227pb
<i>HIRA 14R</i>	CTTGGCACCCACTAACCTGTCTT	23	62.64	52.17	
<i>HIRA 15F</i>	TAGACCTCCAGATCCTTTCAGGATT	25	60.58	44.00	295pb
<i>HIRA 15R</i>	GAACACTGCCACTGTGCTGTT	21	61.62	52.38	
<i>HIRA 16F</i>	TGCAGGTTAAAAGAGCAGAACCTT	24	60.93	41.67	271pb
<i>HIRA 16R</i>	CTTCAAGCTCTAAGTACAGAAAGGT	25	58.54	40.00	
<i>HIRA 17F</i>	TACCAAATGCTACCCCGTAGTGTTA	25	61.57	44.00	188pb
<i>HIRA 17R</i>	AACTGGCAGGGTCCTAGAACTTAC	24	61.85	50.00	
<i>HIRA 18F</i>	GTGTTTACTTCATCCAGGTCAGCT	24	60.80	45.83	225pb
<i>HIRA 18R</i>	AGAATGATGGCATGTGTGCCT	21	60.34	47.62	
<i>HIRA 19F</i>	TTCTCAGTGACGTGGTGTGTGT	22	62.04	50.00	175pb
<i>HIRA 19R</i>	TCTCACCAGACAGAGAGTGTGG	22	61.08	54.55	
<i>HIRA 20F</i>	GCACACTCTGATGTGTTTACCTGG	24	61.86	50.00	276pb
<i>HIRA 20R</i>	CAAAAAGTGTGTGTCTCCTGCAG	23	60.49	47.83	
<i>HIRA 21F</i>	GAAAACACTTGCTGATCAGAGCAC	24	60.85	45.38	164pb

<i>HIRA 21R</i>	TTAGGATGTGGAAAGTGACGGATT	24	60.51	41.67	
<i>HIRA 22F</i>	CAACCAGATCTCTTGGTTTTCTGA	25	60.98	44.00	196pb
<i>HIRA 22R</i>	CATGGCATTACAGGTCACGTACTTG	24	62.20	50.00	
<i>HIRA 23F</i>	CAGTTCCTGACTCTGTGTAGTGC	23	60.86	52.17	234pb
<i>HIRA 23R</i>	GAGCCTCACCTTCGTTTACGA	21	60.07	52.38	
<i>HIRA 24F</i>	CTGTAATTAGGGTTTGAATACCGAC	25	57.76	40.00	112pb
<i>HIRA 24R</i>	AAGAAGCACCTACCACTACTGTTG	24	60.50	45.83	
<i>HIRA 25F</i>	CAATCTAGGTCTCTTCACTGACAC	24	58.59	45.83	232pb
<i>HIRA 25R</i>	ATGTCATCAGCGGCGAGAGT	20	61.67	55.00	
<i>HIRA 26F</i>	ACTCTCGCCGCTGATGACAT	20	61.67	55.00	335pb
<i>HIRA 26R</i>	AAAATGGCTCAATCGTCACTGCT	23	61.37	43.48	
<i>HIRA 27F</i>	CAGCAGTGACGATTGAGCCATTT	23	61.97	47.83	211pb
<i>HIRA 27R</i>	AATTCCTACAAGTGACCAATGTCC	25	59.52	40.00	
<i>HIRA 28F</i>	GGACATTGGTCACTTGTACCAAATT	25	59.99	40.00	225pb
<i>HIRA 28R</i>	AGGCAAGAGAAATCAGGAGGGTTT	24	62.05	45.83	

8.3 DISEÑO DE PRIMERS PARA GEN *TBX1*

EXON	SECUENCIA	PB	TM	% GC	AMP
<i>TBX1 1F</i>	TCTTGTCTTCGCTGCGCATTGCA	23	66.09	52.17	277pb
<i>TBX1 1R</i>	GTTCCGCACGCGAACGCA	18	64.58	66.67	
<i>TBX1 2F</i>	ATTCAGCATCGCCTCTCTGGTTG	23	63.85	56.52	242pb
<i>TBX1 2R</i>	AAGAGCTGCCTCCACCTACTTTGCA	25	66.24	52.00	
<i>TBX1 3AF</i>	TCTCGCATTTCTGCGACGTTGCA	23	65.81	52.17	302pb
<i>TBX1 3AR</i>	GTTCTTCTTCACCGGCGCCTT	21	63.49	57.14	
<i>TBX1 3BF</i>	AAGGCGCCGGTCAAGAAGAAC	21	63.49	57.14	283pb
<i>TBX1 3BR</i>	GACGGCGAACAGCGAAGGA	19	62.91	63.16	
<i>TBX1 4F</i>	TTAGAGCGCTAAGCCAGGAAAGAT	24	61.96	45.83	286pb
<i>TBX1 4R</i>	ACGCTTACAACCACTCGCTCA	21	62.29	52.38	
<i>TBX1 5F</i>	TCTGGGTTACCTCCACATGCA	22	63.89	54.55	304pb
<i>TBX1 5R</i>	GATTCTACAGGCCTCTTAGGGACAG	25	61.96	52.00	
<i>TBX1 6F</i>	CAGGAAACTCATTGCCAACTCAG	23	60.06	47.83	311pb
<i>TBX1 6R</i>	GCTTTTCCAGAGGCGTTGAAT	21	59.46	47.62	
<i>TBX1 7-8F</i>	TCCCTGCAGATCACGCAGCTCAAG	23	66.48	56.52	284pb
<i>TBX1 7-8R</i>	GGAACCCGGATCCCACGACC	20	64.72	70.00	
<i>TBX1 9AF</i>	ACTCCTCGGCCCTCTCCGCA	20	67.48	70.00	269pb
<i>TBX1 9AR</i>	CGGATATTTGTAGGGGTGGTGGTG	24	63.02	54.17	
<i>TBX1 9BF</i>	ACCACCACCCTACAAATATCCG	23	62.02	52.17	209pb
<i>TBX1 9BR</i>	CGACGAGTACATGTTGGCGG	20	61.41	60.00	
<i>TBX1 9CF</i>	CCGCCAACATGTACTCGTCG	20	61.41	60.00	260pb
<i>TBX1 9CR</i>	CCGGATACTTCGATAGCCCAAGG	23	62.48	56.52	
<i>TBX1 9DF</i>	TTGGGCTATCGAAGTATCCGG	21	59.38	52.38	301pb
<i>TBX1 9DR</i>	CAGGCGGCTTCCAAAAGAGG	20	61.59	60.00	

ANEXO 9. CONDICIONES DE ESTANDARIZACIÓN DE PCR

Las estandarizaciones de las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador de gradiente (T-gradient, Biometra), con diferentes condiciones según los exones.

Reactivo	1x
H ₂ O	14.64µl
Taq Buffer+KCl 10X	2.5µl
dNTP's [100mM]	2.5µl
Primer F [10pmol]	1.5µl
Primer R [10pmol]	1.5 µl
Taq. Pol. [5u/ µl]	0.2 µl
MgCl ₂ [25mM]	1.5µl
DNA [100ng/ µl]	1.0 µl
Volumen final	25 µl

CICLO	Tm	PRIMERS	
<p>30 ciclos</p>	56	<i>CRKL 3B*</i>	
<p>30 ciclos</p>	58	<i>CRKL 3S</i>	<i>HIRA 24</i>
<p>30 ciclos</p>	60		<i>HIRA 22</i>

<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	60	<i>CRKL2A</i> <i>CRKL3A</i> <i>CRKL3E*</i> <i>CRKL 3G</i> <i>CRKL 3H</i> <i>CRKL 3J</i> <i>CRKL 3L</i> <i>CRKL 3P</i> <i>CRKL 3Q</i>	<i>HIRA 7</i> <i>HIRA 13</i> <i>HIRA 14</i> <i>HIRA 15</i> <i>HIRA 17</i> <i>HIRA 18</i> <i>HIRA 19</i> <i>HIRA 26</i> <i>HIRA 27</i>
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	60	<i>CRKL2B</i> <i>CRKL3F</i> <i>CRKL3K</i> <i>CRKL3M</i> <i>CRKL3N</i>	<i>HIRAA</i> <i>HIRA4</i> <i>HIRA5</i> <i>HIRA6</i> <i>TBX1-1</i> <i>TBX1-4</i> <i>TBX1-5</i>
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	61		<i>HIRA 10</i> <i>HIRA 12</i> <i>HIRA16</i>
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	62	<i>CRKL 1A</i> <i>CRKL1B*</i>	
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	63	<i>CRKL3T</i>	

<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	63	CRKL1D	TBX1-9D
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	64	CRKL1C*	
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	65		<p><i>HIRA8</i></p> <p><i>TBX1-2</i></p> <p><i>TBX1-6</i></p>
<p style="text-align: center;">30 ciclos</p>	66		<p><i>HIRA9</i></p> <p><i>HIRA11</i></p> <p><i>HIRA 20</i></p> <p><i>HIRA25</i></p>

Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y para identificar las bandas específicas del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 50-100pb y por último se documentaron por fotografía bajo luz ultravioleta (Benchtop 3UV™ Transilluminator) (Figura 18 y 19).

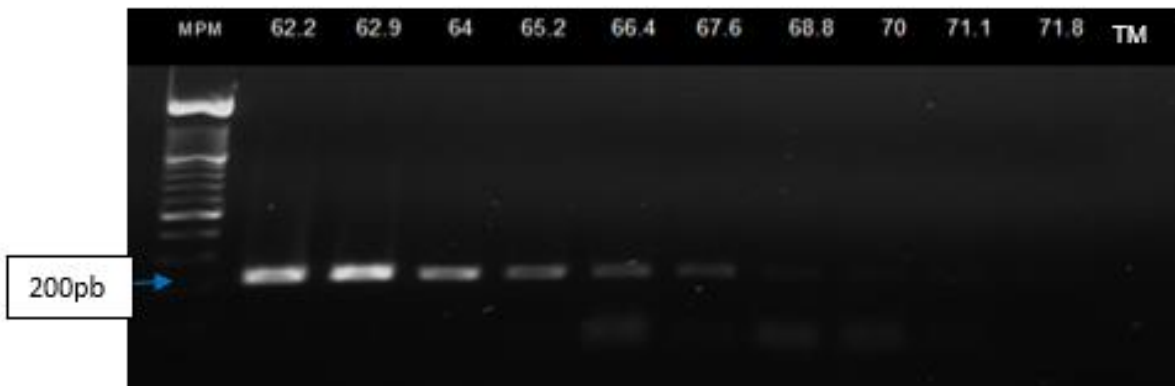


Figura 18. Estandarización de PCR para el exón *CRKL1D* (225 pb) por gradiente de temperatura

(Gel de Agarosa al 1.5%/Bromuro de etidio). (MPM) Marcador de peso molecular ladder 100pb. (TM) Temperatura de alineación.

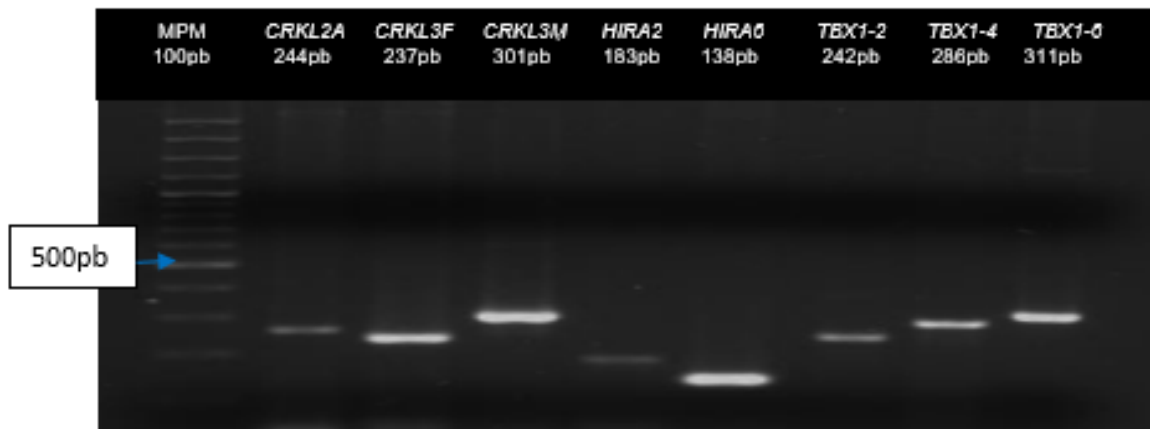


Figura 19. Amplificación de diferentes exones del gen *CRKL*, *HIRA* y *TBX1*

(Gel de Agarosa al 1.5%/Bromuro de etidio). (MPM) Marcador de peso molecular ladder 100pb.