

**ANALISIS CITOGENETICO CONVENCIONAL Y POR  
FISH DE LA REGION 22q11.2 EN PACIENTES CON  
FISURA LABIO-PALATINA Y CARDIOPATIA**

**MÓNICA SARMIENTO SARMIENTO**

**TRABAJO DE GRADO  
BACTERIOLOGÍA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA  
BOGOTÁ D.C. 2012**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

**Artículo 23, Resolución Nº 13 de Julio de 1946**

**“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.**

## Resumen

**Introducción:** La fisura labio palatina es una condición clínica congénita surgida por deficiencia variable de los tejidos que conforman el paladar y labio superior durante las primeras semanas de gestación y asociada en un 30% a factores genéticos. Al igual que las cardiopatías congénitas, la fisura labio palatina está descrita en el síndrome de microdelección 22q11.2 como parte de los 180 signos clínicos conocidos. **Objetivo.** Analizar la presencia de la delección 22q11.2 en pacientes con fisura labio palatina y cardiopatía, mediante técnicas de citogenética convencional y de FISH y establecer su relación con la clínica de los pacientes. **Materiales y métodos.** Se analizaron muestras de sangre periférica de 10 pacientes con fisura labio palatina y cardiopatía, a los que se les realizó 1) estudio citogenético mediante la técnica de bandeado G de alta resolución; y 2) hibridización *in situ* con fluorescencia (FISH) con sonda específica para la región 22q11.2 TUPLE(22q11)/22q13(SHANK3) (Kreatech). **Resultados:** El análisis citogenético no evidenció la presencia de delección en el cromosoma 22 o de la región específica en ninguno de los casos, como tampoco otras alteraciones cromosómicas. El análisis con FISH reveló un caso de microdelección de la región 22q11.2 y otro caso en mosaico, en el resto de casos no se evidenció microdelección en la región de hibridización. **Conclusiones:** La técnica de FISH permitió detectar la microdelección y el mosaicismo, por lo que se convierte en la mejor metodología para la detección de estos. El hallazgo de la delección 22q11.2 en pacientes con fisura labio palatina y cardiopatía asociada, hace de esta patología una condición clínica relevante que requiere atención por la implicación que tiene para el paciente y la posibilidad de afectación familiar.

## Tabla de contenido

1. Introducción .....	7
2. Justificación .....	8
3. Marco Teórico.....	10
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivo General.....	13
4.2 Objetivos específicos.....	13
5. Metodología .....	14
5.1 Selección de pacientes.....	14
5.2 Consentimiento informado.....	14
5.3 Toma de muestras.....	14
5.4 Cariotipo de alta resolución .....	14
5.4.1 Bando G con HCl y Wright.....	15
5.4.2 Reconocimiento cromosómico y elaboración de cariotipo .....	15
5.5 FISH.....	15
6. Resultados:.....	17
7. Discusión .....	23
8. Conclusiones .....	27
9. Recomendaciones.....	28
10. Anexos.....	29
11. Bibliografía .....	30

# 1. Introducción

La fisura labio palatina es una condición adquirida entre la sexta y octava semana de gestación que comprende una deficiencia variable de los tejidos que conforman el paladar y labio superior y es originada por la falta de un proceso consistente en el cierre de estas áreas, que posteriormente dará origen a fisuras faciales cuyo grado de complejidad varía según el tamaño de la ranura ocasionando problemas de succión en la alimentación, poca ganancia de peso, falta de comunicación clara, cambio en la apariencia facial y dificultad para integrarse socialmente.

El síndrome de microdelección 22q11.2 antes conocido como CATCH 22, es la microdelección más común en la población y afecta a 1 de cada 4000 nacidos, se asocia a un patrón de herencia autosómico dominante en algunos casos y la heredabilidad de esta condición es dependiente de factores como sexo, raza, afectados en la familia y factores ambientales, su expresión fenotípica puede variar entre un individuo y otro siendo el caso de un progenitor portador con probabilidad del 50% de afectar a sus hijos y que estos expresen la delección con un fenotipo diferente, sin embargo, en la mayoría de individuos su presencia es *de novo*. Se han descrito aproximadamente 180 signos clínicos para el síndrome entre los que se incluyen la fisura labio – palatina y defectos cardíacos. La microdelección comprende una región de 1.5 Mpb a 3 Mpb en el cromosoma 22 comúnmente descrita como una delección de genes contiguos por el número de genes deletados cuya función en la mayoría de ellos aún no ha sido establecida, sin embargo se cree que uno de los genes más implicados en la expresión fenotípica de fisuras faciales y cardiopatía es el gen TBX1 que provee información para la fabricación de la proteína T-box1 asociado con procesos de formación de órganos y tejidos durante el desarrollo embrionario.

En este trabajo mediante citogenética convencional con bandeado G de alta resolución y FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) se estudiaron 10 pacientes con dos características clínicas relevantes del síndrome de delección 22q11.2, fisura labio palatina y cardiopatía congénita asociada que hicieron sospechar que podrían ser portadores de la microdelección. Para esto se determinó en ellos la presencia o ausencia de la región q11.2 en el cromosoma 22 y su posible implicación en el fenotipo de los pacientes.

Los hallazgos evidenciaron la presencia de la delección 22q11.2 en forma universal en un caso y mosaicismo de dos líneas celulares en otro, los ocho pacientes restantes no presentaron evidencia de la delección mediante FISH en la región 22q11.2.

## 2. Justificación

La fisura labio-palatina es una condición clínica multifactorial asociada a factores genéticos en el 30% de los casos. Se caracteriza por una deficiencia en grado variable de los tejidos que conforman el paladar y labio superior<sup>1</sup> debido a que antes del nacimiento los tejidos que forman el paladar y el labio superior no se unen para cerrarse; la gravedad de este defecto puede variar según el tamaño de la ranura, desde un corte pequeño en el labio superior, hasta una ranura que involucra paladar y nariz, que posteriormente, en el recién nacido, generan dificultad para alimentarse, poca ganancia de peso, retardo en el crecimiento, aumento de la probabilidad de padecer una infección de oído repetitiva y problemas de habla, además de presentar características fenotípicas en su apariencia facial.<sup>2</sup>

El 90% de los casos de fisura labio palatina asociados a factores genéticos, son debidos a un tipo de herencia en el cual se presenta un genotipo predisponente y no sigue los patrones básicos de la herencia mendeliana; la heredabilidad de esta condición o el riesgo de obtenerla depende de factores como el grado de parentesco y el número de afectados en la familia, el sexo y la magnitud de la malformación<sup>3</sup>; se ha asociado con el síndrome velocardiofacial debido a que dentro de las características fenotípicas de este está incluida la fisura palatina y los defectos cardíacos. El síndrome velocardiofacial es ocasionado por una microdelección cromosómica en 22q11.2, la cual puede aparecer *de novo*, o venir como patrón de herencia autosómico dominante, a través de un progenitor portador de la alteración y, por lo tanto, tener una probabilidad del 50% de afectar a sus hijos aunque en ellos la delección se exprese de manera diferente.<sup>4</sup>

Aunque se han realizado estudios sobre malformaciones congénitas en Colombia, aún no se han hecho estudios genéticos en pacientes que presentan fisura labio-palatina asociada con cardiopatía y se desconoce la frecuencia con que la delección 22q11.2 podría estar involucrada en la presentación clínica de esta condición; se conoce que la incidencia de la fisura labio-palatina en Colombia es alta y afecta a 1.5 niños por cada 1000 nacidos<sup>5</sup>, lo que hace que sea de gran importancia estudiar la presencia de la microdelección y su patrón de herencia o los factores a los que puede estar asociada para una adecuada asesoría sobre los riesgos en nuevos embarazos, de la misma manera es importante evaluar diferencias en la presentación clínica de la delección para orientar hacia un posible diagnóstico de delección 22q11.2. Es importante mencionar que los individuos que padecen esta condición tienen dificultades para alimentarse, cursan con infecciones a repetición, baja respuesta inmune y problemas de comunicación, entre otros.

El propósito de éste trabajo fue analizar el cariotipo de pacientes que acudieron a consulta por presentar fisura labio-palatina y que al estar acompañada de otras características fenotípicas como cardiopatía hicieron sospechar una condición sindrómica probablemente asociada a la presencia de la delección de la región cromosómica 22q11.2; el estudio de esta región en estos pacientes contribuye al establecimiento de los factores genéticos que están contribuyendo al surgimiento de esta condición física.

### 3. Marco Teórico

La fisura labio-palatina es una malformación congénita muy frecuente en la población caucásica. Se presenta con una frecuencia de aproximadamente 1 por cada 1000 nacidos vivos; sin embargo, en razas orientales y en algunos países sudamericanos la incidencia es mayor, mientras que en la población de origen negro disminuye<sup>3</sup>. La gravedad de esta condición varía según el tipo de fisura, ya que consiste en la falta de unión de algunos procesos faciales durante el desarrollo embrionario, que posteriormente en el recién nacido genera dificultades para la alimentación, poca ganancia de peso, retardo en el crecimiento, aumento del riesgo de padecer infecciones repetitivas de oído y problemas de habla, auditivos y respiratorios<sup>2</sup>, además de presentar características fenotípicas como el cambio en su apariencia facial. Esta patología puede tener un origen genético o ambiental; en el origen genético se ven involucrados genes que actúan como aditivos y que son modificados por factores presentes en el ambiente y que ocasionan la fisura, este tipo de etiología no se ajusta a un patrón de herencia específico pero se sabe que es dependiente del sexo (más frecuente en varones), de los antecedentes familiares, del grado de consanguinidad y de la magnitud de la afectación; en el origen ambiental hay factores que pueden actuar como teratógenos y estos pueden ser de tipo físico (mecánicos y de radiación), químico (tóxicos y farmacológicos), o biológico (infecciones virales, parasitarias o deficiencias metabólicas)<sup>3</sup>.

Este tipo de malformación congénita ha sido asociado a diversos síndromes entre los cuales se encuentran el síndrome de DiGeorge (ADG), Síndrome velocardiofacial (SVCF), y el síndrome facies-anomalía conotruncal o síndrome de Takao (SFAC).

El síndrome velocardiofacial es el síndrome de microdelección más común reportado con una prevalencia de 1:2000. Este síndrome es causado por una delección en la región 22q11.2 y está asociado frecuentemente a anomalías cardíacas conotruncales, fisura palatina y características faciales que no se expresan en todos los casos en los que se presenta la delección; las principales características son retrognatia, exceso vertical maxilar, nariz "grande y bulbosa" con raíz nasal cuadrada, base alar estrecha, anomalías auriculares menores, hendidura del paladar secundario, insuficiencia velofaríngea, además de manos y dedos afilados, cabello abundante, párpados superiores encapuchados e hipertelorismo en algunos casos y afecciones cardíacas como tetralogía de fallot y arco aórtico derecho o anomalías menores de los vasos.<sup>4-6</sup>

A principios de la década de los 90 por medio de estudios citogenéticos-moleculares y signos clínicos comunes entre síndrome de Di George y síndrome velocardiofacial se pudo determinar que ambos tenían en común una

microdelección en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.2)<sup>8</sup>, observada en cromosomas por medio de bandeos G de alta resolución, cuyos resultados pudieron ser corroborados mediante técnicas de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) la cual tiene una mayor especificidad y mayor capacidad de detección de microdeleciones. Esta técnica permite detectar pequeñas alteraciones imposibles de visualizar por citogenética convencional y es conocida como el *Gold standard* para la microdelección de 22q11.2; estudios recientes han demostrado que la microdelección en 22q11.2 está presente en el 90% de los pacientes con síndrome de DiGeorge en el 70% en pacientes con síndrome velocardiofacial y en hasta en un 15% de pacientes con defectos conotruncales aislados<sup>8</sup>. Por otra parte las cardiopatías congénitas tienen un origen etiológico heterogéneo por lo que es posible encontrarlas en forma aislada o acompañadas de otras malformaciones constituyendo un síndrome, cuya causa puede ser la presencia de anomalías cromosómicas (5 a 10%), defectos monogénicos (3 a 4%) o por teratógenos (1 a 2%), el porcentaje restante es atribuido a la relación entre los genes y el ambiente.<sup>8</sup>

Un estudio realizado por el CDC (*centers for disease control and prevention*) reportó que la delección 22q11.2 tiene mayor prevalencia en ciertos grupos étnicos y que ocurre con mayor frecuencia en población hispana en comparación con la población blanca, afro americana y asiática (1 en 6000)<sup>9</sup>. La mayoría de niños afectados por la delección padecen defectos cardíacos y diferentes a anomalías velopalatinas; en una proporción de 1 por cada 3 tienen defectos extracardíacos como anomalías en el sistema nervioso central, deficiencia inmunológica y dificultad en el aprendizaje.<sup>10</sup>

En los casos de síndrome de delección 22q11.2 se ve afectada una región que comprende entre 1.5 Mpb a 3 Mpb y contiene entre 30-40 genes incluyendo el gen TBX1 cuya función es proveer información para la fabricación de una proteína llamada T-box1, la familia de estas proteínas cumplen un papel importante en la formación de tejido y órganos durante el desarrollo embrionario; cambios en la función normal de T-box1 o una disminución de la cantidad de esta proteína, ocasionada por mutación en el gen o delección en el cromosoma 22 están asociados con los signos presentes en el síndrome de delección 22q11.2 como: defectos cardíacos, paladar hendido, rasgos faciales, pérdida de audición, hipocalcemia y en algunos casos cambios en la conducta<sup>12</sup>, también se ha encontrado mutación de este gen en personas con Síndrome de DiGeorge sin delección en el cromosoma 22<sup>13</sup>

Ante la falta de información acerca de los factores genéticos responsables de la fisura labio palatina en nuestra población, se hace necesario realizar estudios para hacer una aproximación al origen de la patología en los pacientes y de ésta manera orientar su prevención, tratamiento y el asesoramiento familiar. Al hacer la valoración fenotípica del individuo se debe hacer un diagnóstico de su condición clínica sindrómica (defectos del corazón, anomalías del paladar como el paladar hendido y dificultades en el habla, infecciones del oído medio o la pérdida de audición, dificultades para la alimentación, niveles bajos de calcio en sangre, problemas del sistema inmune que puede aumentar el riesgo de infecciones, dificultades de aprendizaje y retrasos en el desarrollo, comunicación y de interacción social) y procederse a realizar pruebas citogenéticas por bandejo G de alta resolución y FISH u otra técnica de citogenética molecular, para establecer si la presencia de la delección de 22q11.2 es la causante del fenotipo. Finalmente se sugerirá como tratamiento la cirugía según sea el grado de afección de cada paciente, asesoría psicológica y la asesoría genética en los casos relevantes, es decir cuando a partir de los resultados se determine un posible origen parental.

## **4. Objetivos**

### ***4.1 Objetivo General***

Analizar la presencia de la delección 22q11.2 en pacientes con fisura labio palatina y cardiopatía, mediante técnicas de citogenética convencional y de FISH, y establecer su relación con la clínica de los pacientes.

### ***4.2 Objetivos específicos***

- Realizar cariotipo en linfocitos de sangre periférica para detección de la delección 22q11.2 u otras anomalías cromosómicas por medio de la técnica de bandeo G de alta resolución
- Establecer la presencia de la delección 22q11.2 por medio de la técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) mediante el uso de la sonda TUPLE (22q11)/22q13(SHANK3) (Kreatech)
- Analizar los resultados obtenidos en relación con la clínica de los pacientes.

## **5. Metodología**

### ***5.1 Selección de pacientes***

Los pacientes con fisura labio–palatina que participaron en el estudio fueron seleccionados a través de la consulta del programa “operación sonrisa”, con otros signos clínicos como cardiopatía, que hicieron sospechar que podrían ser portadores de la delección 22q11.2.

### ***5.2 Consentimiento informado***

Posterior a la selección del paciente se informó y se explicó las características y la importancia del estudio a sus familiares o su tutor, quienes luego de haber aceptado su participación en el estudio firmaron su consentimiento para la realización de las pruebas.

### ***5.3 Toma de muestras***

Se tomaron las muestras de sangre de los pacientes en tubos de 5 ml con anticoagulante de heparina y se asignó un número de identificación a cada uno.

### ***5.4 Cariotipo de alta resolución***

Para este procedimiento en cada paciente se colocaron en 2 frascos de cultivo 5 ml de medio nutritivo RPMI, suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB), fitohemaglutinina (FHA) y aproximadamente 0.25 ml de la muestra de sangre total para la obtención de un cultivo óptimo. Los frascos fueron marcados con el número de identificación del paciente, e incubados a 37°C. A las 48 horas se agregó a cada frasco de cultivo 50 µl de metrotexate se protegieron de la luz y se dejaron en incubación a 37°C por 17 horas.

Luego de 17 horas se pasó el contenido de los frascos a tubos y se hicieron dos pases de lavados por centrifugación y uso de medio RPMI y SFB al 10%, al final se pasaron los botones celulares de nuevo a frascos de cultivo con medio RPMI suplementado con SFB al 10% y 50µl de timidina y se incubó de nuevo por 5 horas a 37°C.

Cumplidas las cinco horas de incubación se les agregó 50µl de colchicina por 10 min se centrifugó y se retiró el sobrenadante, se les agregó 8 ml de solución hipotónica (KCl 0,075 M) para una adecuada dispersión de los cromosomas. por 15 minutos y se dejó en incubación a 37°C.

Se agrego 1ml de solución de solución fijadora (3:1 partes de metanol : ácido acético), se homogenizó por inversión, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se volvió a agregar fijador a la muestra, se resuspendió y se refrigeró durante 20 minutos a una temperatura aproximada de -20°C.

Los tubos fueron retirados de refrigeración, se realizaron dos centrifugaciones cada una con 10 ml de fijador, y se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 0.5 ml para el goteo sobre placa.

Se dejaron caer 3 gotas sobre lámina portaobjetos previamente limpiada y desengrasada, se dejaron secar y se observaron al microscopio por contraste a un aumento de 10x la calidad de las metafases y luego se almacenaron hasta el bandeado.

#### ***5.4.1 Bando G con HCl y Wright***

Laminas extendidas días anteriores fueron puestas al horno a 37°C la noche anterior, al día siguiente la temperatura fue aumentada a 100°C por 20 minutos y luego se procedió a realizar el bando introduciendo las laminas en una solución de HCl 0.025 M por 3 segundos, se lavaron con abundante agua y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se introdujeron en una solución 1xSSC a 50°C, se lavaron con agua y se secaron.

La solución colorante fue preparada con 3 partes de solución de Sorensen y 1 parte de colorante de Wright, se colorearon las láminas por 3 minutos, se lavó con agua corriente, se dejaron secar y se cubrieron con láminas cubreobjetos y entellan.

#### ***5.4.2 Reconocimiento cromosómico y elaboración de cariotipo***

Se procedió a hacer reconocimiento de cromosomas para poder ser organizados de acuerdo a su tamaño y morfología conformando un cariotipo, e identificar anomalías numéricas o estructurales en cada caso. Se evaluaron 25 metafases de buena calidad por paciente y se tomó fotografía para elaborar el cariotipo y el informe del resultado.

### ***5.5 FISH***

Las laminas extendidas previamente con los preparados cromosómicos fueron puestas en una solución de formamida al 70% en 2xSSC a 71°C durante 30 segundos, se sacaron y se dejaron escurrir libremente, luego se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol al 70%, 90% y 100% durante 2 minutos en cada una. La sonda fue denaturada sumergiéndola en el baño serológico a 71±1°C durante 5 minutos aislada de la luz, una

vez lista la lamina y denaturada la sonda se colocaron 10µl de esta última sobre la lamina, se cubrió con cubre objetos de 22x22mm y se sellaron los bordes alrededor de la laminilla para evitar la evaporación de la sonda, luego se incubó para la hibridación en cámara húmeda a 37°C por 16 horas.

Pasadas las 16 horas se calentaron en baño a  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$  las soluciones de formamida al 50% en 2xSSC, 2xSSC y 2xSSC con tween 20 0.1%, se lavaron las preparaciones con estas soluciones, se dejaron escurrir y se colocaron 10 µl de DAPI- antifade evitando la formación de burbujas y retirando el exceso de DAPI, se dejaron en reposo por 30 minutos para la incorporación de la contratinción y se procedió a la observación de señales en microscopio de fluorescencia.

## 6. RESULTADOS:

Se analizaron 10 pacientes 7 de sexo masculino y 3 de sexo femenino, con edades entre los 2 y los 17 años de edad. Todos presentaron como características comunes fisura facial y cardiopatía; la fisura facial presentó varias características así: Fisura labio palatina bilateral completa (FLPBC), Fisura labial completa (FLC), Fisura palatina (FP), Fisura labio palatina unilateral izquierda (FLPUI), Fisura labio palatina unilateral derecha completa (FLPUDC), fisura labial (FL), fisura paladar completa (FPC), fisura labio palatina unilateral izquierda completa (FLPUIC), paladar hendido (PH) y en cuanto a la cardiopatía nueve casos presentaron soplos cardiacos con diferentes grados de severidad y un caso con ductus arterioso persistente.(Ver tabla 1) Otro rasgo clínico relevante encontrado fue la presencia de alteraciones en el desarrollo psicomotor en cuatro pacientes, tres de ellos en grado bajo y uno en grado moderado. (Ver tabla 1)

Cuatro pacientes además tuvieron antecedente familiar, el cual fue relevante como factor hereditario a ser considerado en el estudio, tres casos fueron por línea paterna y uno por línea materna.

El análisis de cariotipo se evidenció una constitución cromosómica normal en todos los pacientes, cada uno con los respectivos 46 cromosomas que corresponden a cariotipo humano normal sin ninguna alteración en el número ni en la estructura de los cromosomas, 46,XX para las mujeres (Ver figura 1) y 46,XY para los hombres(Ver figura 2). Un hallazgo adicional fue la expresión de fragilidad cromosómica en varios cromosomas y bandas cromosómicas en todos los casos y en algunos de ellos rearreglos cromosómicos aislados y la alteración en el tamaño de algunos polimorfismos cromosómicos (1qh+, 9qh+, Yqh+, Yqh-) (Ver tabla 2)

En el análisis citogenético por FISH ocho pacientes mostraron señales normales de hibridización tanto para la región 22q11.2 como para la región 22q13 (señal control): 46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2) (ver figura 2). En dos casos se evidenció ausencia de la región 22q11.2, el caso 41 con presencia de la delección en forma universal: 46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-) (ver figura 3); y el caso 51 con presencia de la delección en forma de mosaico 46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-)/22q11.2(TUPLEx2) (ver figura 4).

**Tabla 1.** Características clínicas del grupo de pacientes analizados

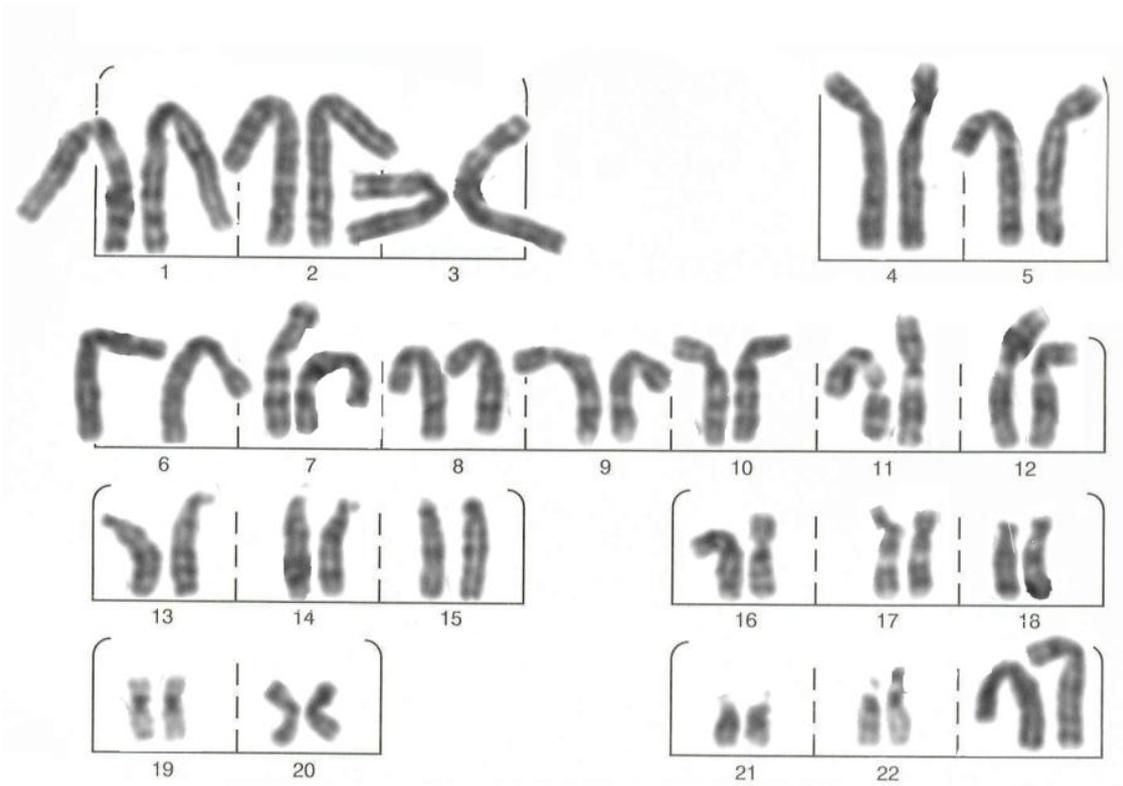
ID de caso	Sexo	Edad (años)	Tipo de fisura	cardiopatía	Antecedente familiar	Desarrollo psicomotor
20	M	10	FLPBC	Soplo sistólico grado II/IV	Tía materna FLU	Normal
23	F	6	FP	Soplo sistólico grado I/IV	Ninguno	Bajo
25	F	17	FLPUI		Primo paterno LPH	Normal
30	M	8	FLPUD C	Soplo sistólico grado II/IV, hipoacusia bilateral	Ninguno	Normal
35	M	10	FLUI		Tía paterna FL y tatarabuela paterna con FLPBC	Normal
36	M	8	FLPBC	Soplo sistólico grado I/IV en foco mitral	Ninguno	Normal
41	M	12	FPC	Ductus arterioso persistente	Ninguno	Moderado
42	M	3	FLPUIC	Soplo sistólico grado I/IV	Ninguno	Normal
49	F	10	FP	Soplo sistólico grado II/IV	Tío paterno con PH	Bajo
51	M	14	FLPBC	Soplo sistólico grado II/IV	Ninguno	Bajo

F: femenino; M: masculino FLPBC (Fisura labio palatina bilateral completa), FLC (Fisura labial completa), FP (Fisura palatina), FLPUI (Fisura labio palatina unilateral izquierda), FLPUDC (Fisura labio palatina unilateral derecha completa), FL (fisura labial), FPC (fisura paladar completa), FLPUIIC (fisura labio palatina unilateral izquierda completa), PH (paladar hendido), LPH (labio paladar hendido)

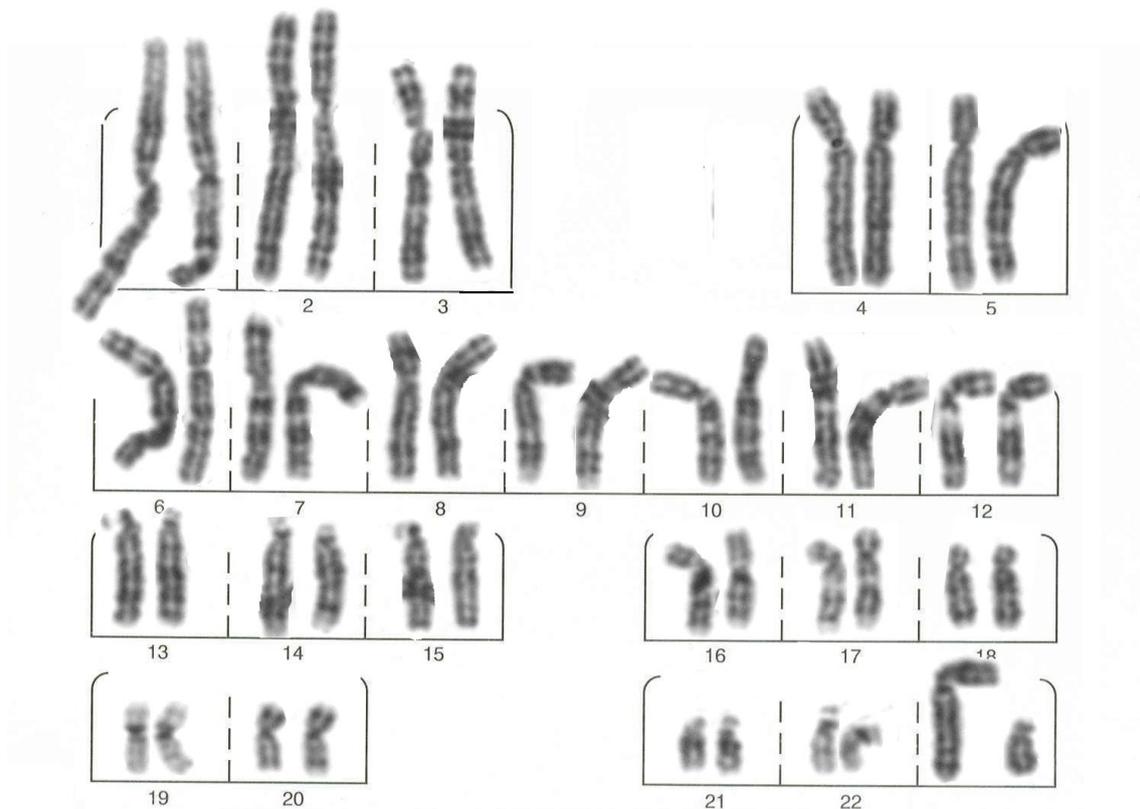
**Tabla 2.** Hallazgos citogenéticos y moleculares en los pacientes analizados

ID de caso	Cariotipo	FISH	Otros hallazgos citogenéticos
20	46,XY	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2)	chr1p32, chr1q21.3, chtb 2q11.2, chr2q14, chr2q24.2, chr3p14, chr3q21.3, chr5q31, chr6q26, chtb 7p21.1, 8p11.2, chtb11q14.2, chr1q21, chtb 7q36,
23	46,XX	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2)	1qh+, 9qh+, chr3p14, chr6q26, chr11q13.13, chtb3p14, chtb11q14.2, chtb19p13.1, chtb12q15, chtb6q26, 22qter?,
25	46,XX	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2)	chtb3p14, chr3p14, chr6q26, chtb1p12.1, chr1p32, del(9)(q12)
30	46,XY	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2)	chtb2q16, chr2q24.2, chtb3p14, chtb4p12 chr6q26, chtb11q21, chth12q22, chtbXp22.2, chtbXp11.21,
35	46,XY	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2)	chtb1p31.2, chr1q21.3, chr2q34, chtb3p14, chr3p14, chtb6q26, chtbXq22.1
36	46,XY	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2)	chr1p36.1, chr1q21, chtb2p15, chr2q33, chtb3p14, chr3p14, chr6p21.3, chtb6q26, chtb7p11.2, chr7q21, inv(14)(q11q32), chr13q21, chtb16q23
41	46,XY	46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-)	chr10q22.1
42	46,XY	46,XY. ish 22q11.2(TUPLEx2)	chr2q31, chtb3p14, chr4q31, chtb7q31.2 chtb7q32, chtb11p15.3, chtb11q13, chr12q24.3, chtb14q21.1, chtb15q24, chtb16q23, chtb20q13.3, Yqh+,
49	46,XX	46,XY.ish 22q11.2(TUPLEx2),22q13(SHANK3X2)	chr1p34, chtb2q31.1, chtb4q23, chtb9q12, chtb17q21
51	46,XY	46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-), 22q11.2(TUPLEx2)	Yqh-,

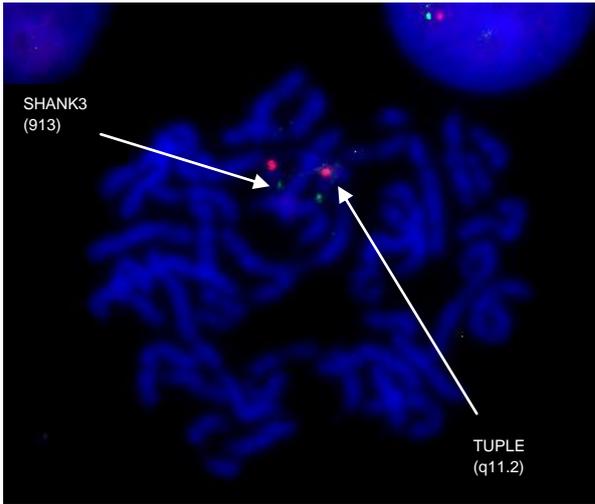
Chtb: rotura cromatídica; chr: gap cromosómico; qh+: aumento tamaño de la heterocromatina del brazo largo; qter?: telomero del brazo largo; del: deleción; inv: inversión; qh-: disminución tamaño de la heterocromatina del brazo largo



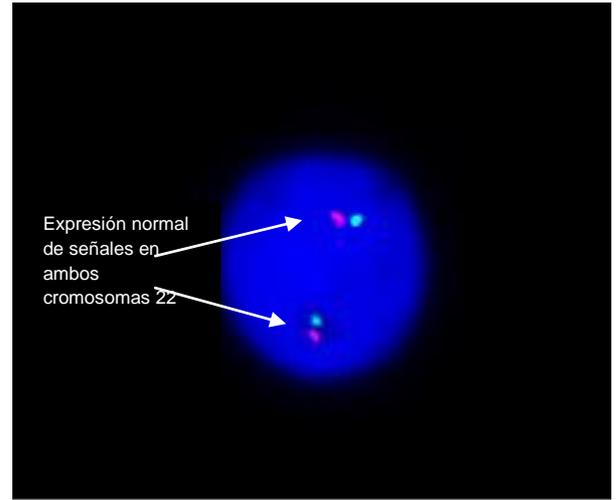
**Figura 1.** Cariotipo femenino 46, XX sin anomalías cromosómicas de paciente 23



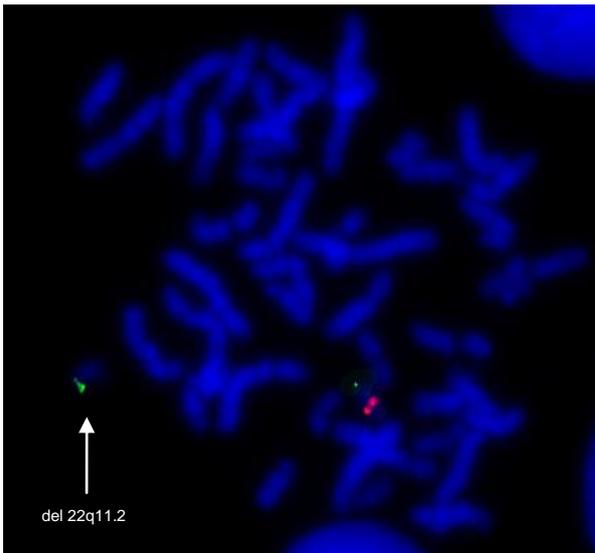
**Figura 2.** Cariotipo masculino sin anomalías cromosómicas de paciente 20. 46, XY chrg3p14



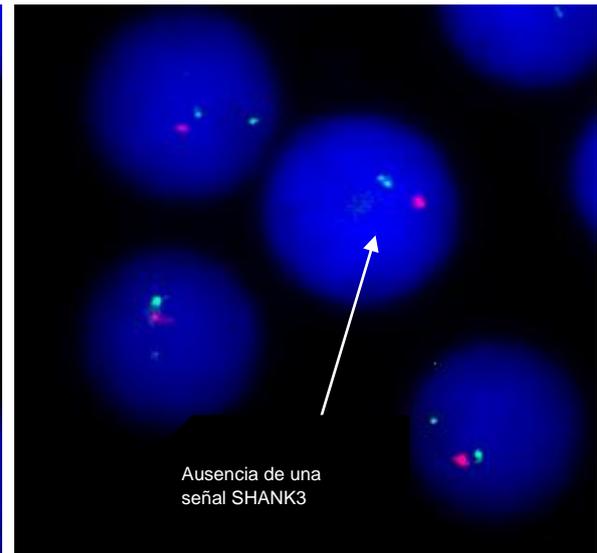
**Figura 3a** . FISH en metafase de caso 23, indicando hibridación de las dos regiones en los dos cromosomas 22 (q11.2: roja y q13: verde)



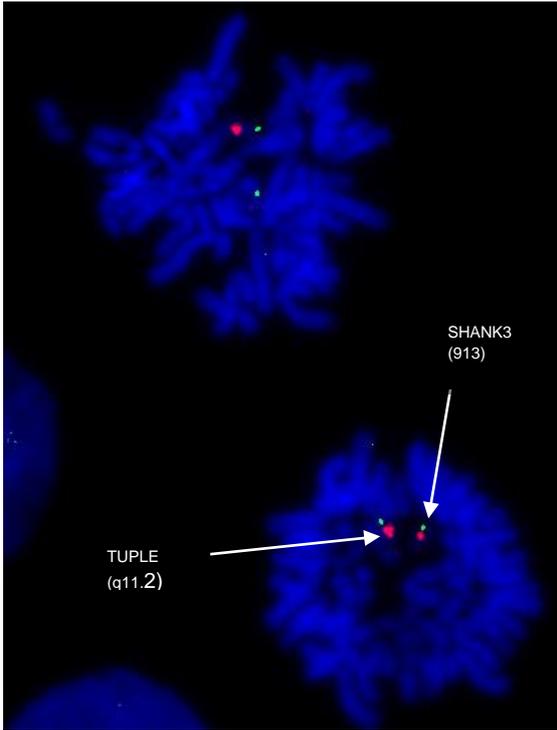
**Figura 3b**. FISH en núcleo interfásico de caso 25 indicando la detección de las dos regiones en ambos cromosomas 22 (q11.2: rojo y q13:verde)



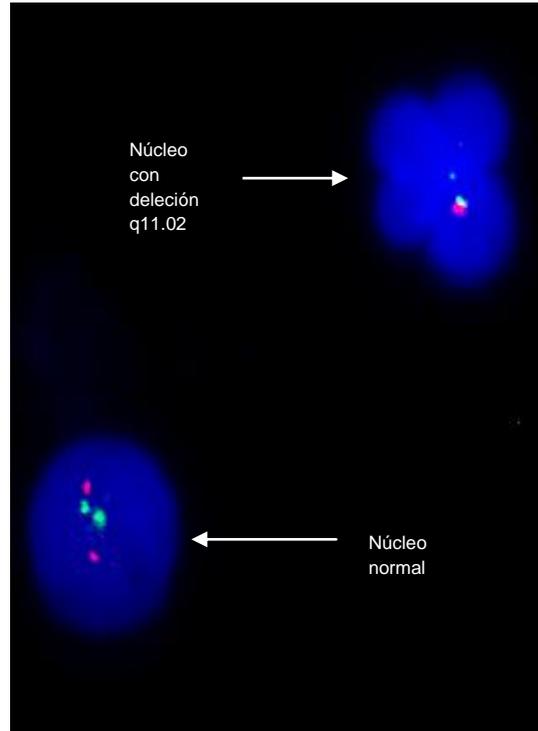
**Figura 4a**. FISH en metafase de caso 41, indicando delección de la región q11.2 en un cromosoma 22 (ausencia de la señal roja).



**Figura 4b**. FISH en núcleos interfásicos de caso 41, indicando delección de la región q11.2 en un cromosoma 22 (ausencia de una señal roja).



**Figura 5a.** Presencia de mosaïcismo en metafase de caso 51, Superior: ausencia de la señal roja en un cromosoma 22 indicativo de delecci3n de la regi3n de hibridaci3n q11.2, en un cromosoma 22, Inferior: hibridaci3n de las dos regiones en los dos cromosomas 22.



**Figura 5b.** Presencia de mosaïcismo en núcleos de caso 51, Superior: ausencia de la señal roja en un cromosoma 22 indicativo de delecci3n de la regi3n de hibridaci3n q11.2, en un cromosoma 22, Inferior: hibridaci3n de las dos regiones en los dos cromosomas 22.

## 7. Discusión

Entre los 180 signos clínicos conocidos que se relacionan con la microdelección de 22q11.2 están la fisura labio-palatina y la cardiopatía congénita, siendo esta última una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en pacientes, principalmente por alguna forma de enfermedad coronaria<sup>11</sup>. Cuando hay sospecha de delección 22q11.2 se recomienda un examen citogenético de rutina corroborado con FISH ya que en <1% de los casos se presentan rearrreglos cromosómicos que involucran la región 22q11.2, como traslocaciones con otros cromosomas<sup>13</sup>. Los 10 pacientes incluidos en el estudio presentaron características clínicas para ser considerados como candidatos a ser portadores de la microdelección 22q11.2 y por lo tanto sugerir que su fenotipo podría ser reflejo de la pérdida de material genético en esta región cromosómica; los cuadros clínicos incluyeron malformación cardíaca congénita y fisura facial con diferentes grados de severidad, tamaño y ubicación de la fisura, además de presencia de retardo en el desarrollo psicomotor y antecedentes familiares de importancia en algunos casos. A pesar de ser todos candidatos para la delección solo dos pacientes mostraron el genotipo de pérdida de la región 22q11.2 (Tabla 2).

La aparición de la fisura labio palatina al igual que la cardiopatía congénita en pacientes con delección 22q11.2 no está aun bien definida, sin embargo se ha asociado a la delección del gen TBX1 incluido en la región de la delección cuya función es estimular la producción de la proteína T-box1 involucrada en procesos de formación de órganos y tejidos durante el desarrollo embrionario<sup>12</sup>. Es posible que por la interrupción del proceso de formación de la proteína T-box1 al estar el gen TBX1 ausente se genere un fenotipo característico de la microdelección de 22q11.2 como las cardiopatías y la fisura presentes en la clínica del paciente que los hace candidatos a ser estudiados en busca de la delección y a sus progenitores en caso de sospecharse un patrón de herencia autosómico dominante como el que se presenta cuando la patología está asociada a un factor genético. La fisura palatina también se ha asociado a factores ambientales<sup>3</sup>, los cuales es posible que influyan sobre las células germinales de los progenitores o durante el desarrollo embrionario, esto abre la posibilidad de que producto de daño en el material genético se pueda generar eventualmente alteraciones cromosómicas como la delección 22q11.2 en células germinales que sean transmitidas a los productos de fecundación, o adquiridas en etapas muy tempranas del desarrollo y de esta manera tener un hijos afectados por la delección. En la muestra analizada dos de los casos: 41 y 51 los cuales fueron portadores de la delección podrían concordar con esta hipótesis; el caso 41 muestra la delección en forma universal lo que podría concordar con un posible surgimiento durante la meiosis de alguno de los

progenitores, mientras que en el caso 51 la delección está presente en forma de mosaico, compatible con un origen probable poscigoto. Estos dos casos no informaron antecedente familiar, sin embargo es necesario analizar también a los padres para descartar el que el rasgo sea heredado. Autores reportan que debido a que el síndrome de delección 22q11.2 es de herencia autosómico dominante en el 7% de los casos y en el 93% de los casos se presenta de novo, es necesario realizar FISH a ambos padres, los padres con FISH normal el riesgo de recurrencia es menos del 1% y está determinado por mosaicísmo germinativo y somático, cuando esta alterado el riesgo aumenta hasta a un 50%.<sup>19</sup>

Se han descrito casos de mosaicísmo para 22q11.2 detectados por FISH en los que los pacientes presentan las mismas características clínicas que un paciente con delección universal y que en su mayoría cursan con cardiopatía y fisura<sup>18</sup>. El caso 51 al cual se le detectó la delección en forma de mosaico mediante FISH (figura 5a), concuerda con esta descripción, tiene fisura palatina, soplo sistólico grado II/IV y afectación del desarrollo psicomotor. Los mosaicos pueden estar presentes en un muy bajo número de células sanguíneas (mosaicos de baja proporción), por lo que varios estudios sugieren descartar la posibilidad de limitar este hallazgo a células de sangre periférica y realizar FISH en células de origen endodérmico como de la orina, o en células de origen ectodérmico como las bucales. Se recomienda en todos los casos la realización de FISH para detectar un mosaico para la región 22q11.2 y extremar los cuidados en el análisis ya que las señales emitidas pueden verse afectadas en los núcleos en interfase, por el tipo de sonda y de la muestra.<sup>18</sup> En este estudio aunque se sospecha de un mosaico de baja proporción ( $\approx 10\%$ ) no se logró establecer con precisión este porcentaje, por lo que se recomienda realizar el estudio en células de otro tejido con FISH para realizar correlación con la clínica.

El síndrome velocardiofacial (SVCF) fue descrito en 1978 y se caracteriza por incluir fisura palatina y anomalías cardíacas conotruncales, un fenotipo característico y problemas de aprendizaje; pueden presentar nariz prominente con raíz nasal cuadrada, hipoplasia del área malar, retrognatia y anomalías auriculares menores, también presentan voz hipernasal debido a la incompetencia velofaríngea o fisura palatina<sup>14</sup>. El grupo de pacientes que hicieron parte del estudio, mostraron características clínicas comunes al síndrome velocardiofacial, pero sin llegar a ser completamente compatibles con este. El hallazgo de dos pacientes con la delección en 22q11.2 confirma el amplio espectro de expresión del fenotipo descrito, el cual se expresa con diferentes grados de afectación; se ha sugerido que esto puede estar influenciado por la carga genética del individuo y el entorno ambiental al que este ha estado expuesto<sup>3-8</sup>

La citogenética clásica de alta resolución no reveló la deleción en el cromosoma 22, sin embargo es necesario realizarla a todos los pacientes con una clínica similar ya que se debe descartar la presencia de otras anomalías citogenéticas que pudieran generar un fenotipo similar.

En la muestra analizada tampoco se hallaron anomalías cromosómicas que justificaran el fenotipo, sin embargo se observó elevada expresión de fragilidad en algunos casos, y presencia de rearrreglos cromosómicos aislados, probablemente por la elevada inestabilidad de los cromosomas (Ver tabla 2) Esta fragilidad fue observada en distintas regiones cromosómicas y en diferentes cromosomas siendo la región más afectada y común a todos los casos p14 en el cromosoma 3 (ver figura ..), estas regiones frágiles se presentan por inhibición parcial de la replicación de ADN en sitios específicos y constituyen de esta manera sitios o zonas de la cromatina que no se condensa durante el proceso de la mitosis, formando brechas o gaps, o ligeras fracturas en el cromosoma <sup>15-16</sup>. La mayoría de regiones frágiles puede ser heredada de forma codominante por expresión de ambos alelos en el fenotipo y su ubicación no varía de un individuo a otro. El sitio FRAB3B ubicado en la región p14 del cromosoma 3 se destaca como el sitio frágil más común en el genoma humano; basados en el hallazgo de la lectura de 25 metafases por cada paciente se puede determinar que las fragilidades corresponden al grupo de sitios frágiles comunes que no son significativos y están presentes en todos los individuos. Se han descrito factores asociados a la fragilidad cromosómica, incluyendo patógenos como virus y bacterias que inducen en daño en el ADN y aumentan la fragilidad cromosómica, fármacos genotóxicos que causan inestabilidad genómica , drogas alquilantes en dosis aumentadas que repercuten especialmente en el cromosoma 5, tóxicos de acción clastogénica como heroína y cocaína que causan daño en el ADN y se relacionan enfermedades del paciente como anemias por déficit de vitB12 y folatos.<sup>15</sup> Aunque la expresión de fragilidad es común en los cromosomas en algunos casos analizados hay una expresión aumentada de esta, por lo que se recomienda el análisis de factores externos o internos del individuo que influencien este grado de inestabilidad.

Otro hallazgo en el cariotipo fue la variación en el tamaño de algunas regiones polimórficas en cromosomas (ver tabla 3). Los polimorfismos son variantes del genoma que se transmiten de generación en generación y así mismo van adquiriendo frecuencia en la población, <sup>17</sup> Se ha descrito que ciertos polimorfismos como Yqh+ y Yqh- podrían estar asociados a retaso mental y problemas en sistema reproductor, consistente en abortos e infertilidad.<sup>17</sup>

Ocho de los pacientes incluidos en este estudio presentaron las características comunes y asociadas al síndrome de deleción 22q11.2 candidatos para ser portadores de la deleción, sin embargo en la lectura de metafases y núcleos

interfásicos realizada en FISH no se encontró evidencia de delección de la región, ya que presentaron dos señales de la sonda control (SHANK3) y dos señales de la sonda específica para la región 22q11.2 (TUPLE). Varias publicaciones hacen referencia a que algunos individuos con características típicas del síndrome de delección 22q11.2 pueden no mostrar la delección por FISH con sondas comunes como TUPLE y N25 ya que estas no alcanzan a detectar una delección de menos de <40Kb y tampoco muestran la mutación en TBX1<sup>13</sup>, por esta razón no se puede asegurar que los pacientes de este estudio que dieron negativos por FISH para la delección, realmente no la tengan ya que existe la posibilidad de que la delección no entre en el área que cubre la sonda TUPLE; por esta razón es conveniente aplicar otra técnica de citogenética molecular como MLPA para la región 22q11.2, la cual rastrea toda la región y con precisión puede detectar pequeñas pérdidas de material genético en la región de interés.

## 8. Conclusiones

El análisis de cariotipo realizado al grupo de pacientes no evidenció anomalías cromosómicas visibles que involucraran el cromosoma 22 o la región 22q11.2; tampoco se observaron otras anomalías que hicieran sospechar una relación con el fenotipo.

Se identificó por medio de la técnica de FISH en los pacientes con fisura labio-palatina y cardiopatía la presencia de delección 22q11.2 en 2 pacientes, en un paciente se evidencio la delección de manera universal y en otro se halló la delección en mosaico, el resto de los pacientes expresaron las señales de hibridización completas para el control y la región específica sin ninguna alteración, de esta manera es posible también confirmar la sensibilidad de la prueba para detectar la delección de la región y de manera específica los casos de mosaicos en relación con las técnicas de citogenética clásica .

Los pacientes portadores de la delección mostraron fisura labio palatina, anomalía cardiaca y alteración en el desarrollo psicomotor; características clínicas relevantes dentro del síndrome de delección 22q11.2.

El análisis de las características clínicas de los pacientes, de cariotipo y de FISH permitió comprobar la elevada variabilidad fenotípica expresada en los pacientes que hacen sospechar que puedan ser portadores de la microdelección 22q11.2.

La delección 22q11.2 en pacientes con fisura labio palatina asociada con cardiopatía puede considerarse relevante en la población colombiana y requiere atención por la implicación para el paciente y la posibilidad de afectación familiar.

## 9. Recomendaciones

Indagar sobre los posibles factores ambientales de riesgo como la exposición de los padres a agentes que puedan causar daño en las células germinales y que puedan originar anomalías como la deleción 22q11.2 en la descendencia, y el estudio al grupo familiar de los pacientes con la deleción aunque no presenten características evidentes.

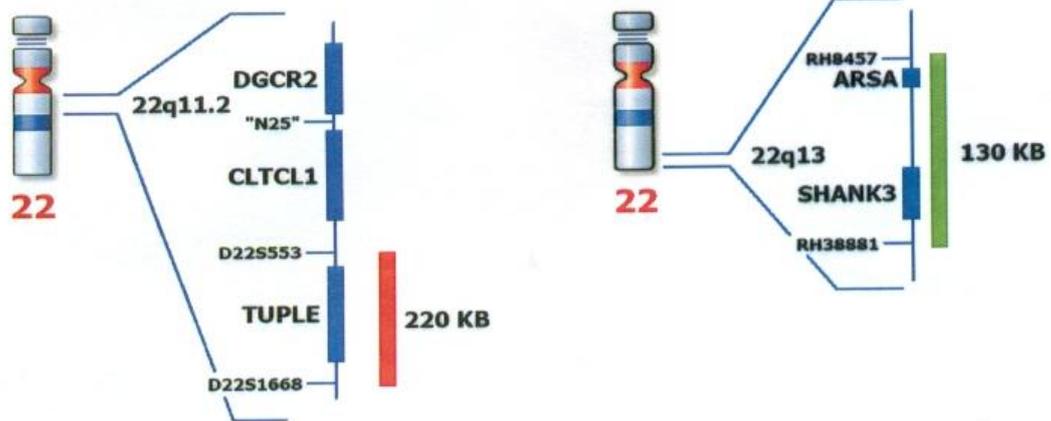
Para el caso 51 en donde se evidenció una constitución en mosaico de baja proporción, se sugiere corroborar el resultado obtenido mediante la ampliación de la lectura por FISH en 100 metafases o en 400 núcleos, y analizar otros tipos de muestra como células bucales o de orina.

Analizar los resultados hallados con FISH mediante la técnica MLPA para corroborar presencia de deleción por fuera del área de hibridización y de esta manera establecer la amplitud de la región de deleción en los dos pacientes afectados.

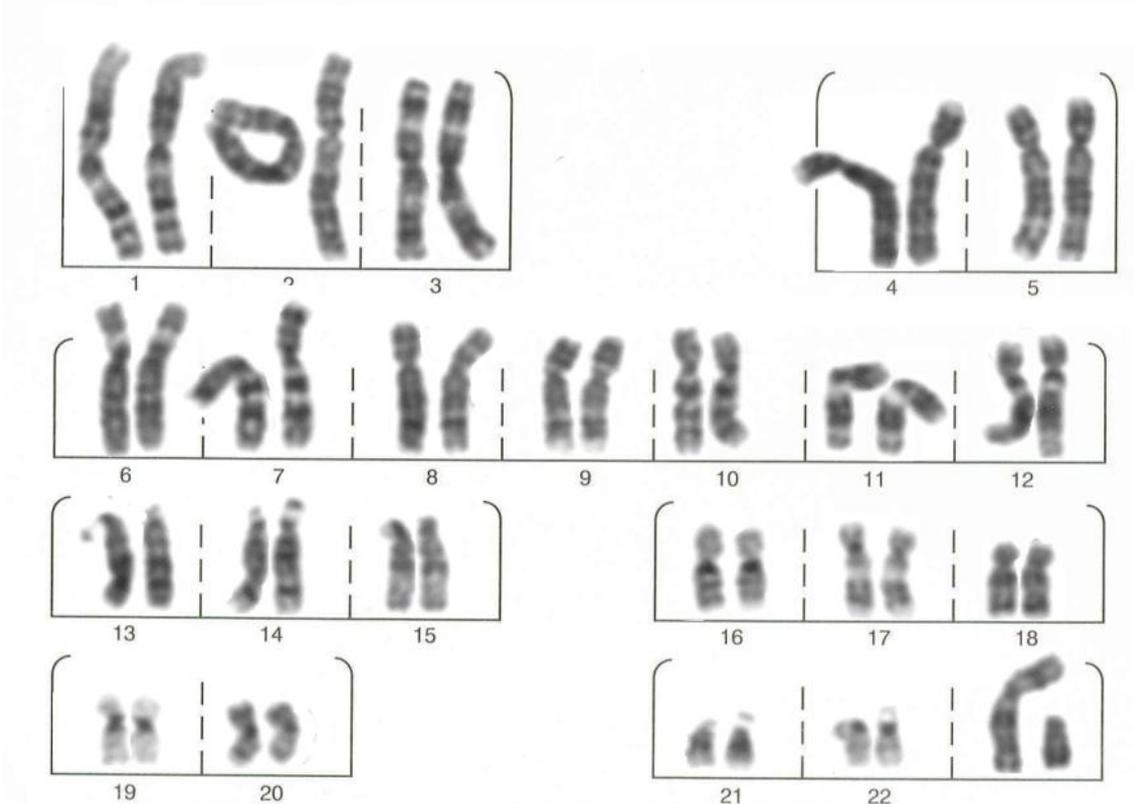
Realizar siempre además de la citogenética clásica, citogenética por FISH para evidenciar los casos positivos para la deleción y en especial para detectar los casos de mosaicismo dado que ninguna otra técnica permite discriminar los mosaicos.

Se recomienda realizar MLPA a los pacientes cuyo resultado haya sido negativo por FISH con el fin de corroborar el resultado, ya que puede que la deleción se encuentre por fuera del área de hibridización detectada por el FISH.

## 10. ANEXOS



**Anexo 1.** Ideograma cromosoma 22, y sondas específicas de cada región (tomado de inserto Kreatech)



**Anexo 2.** Cariotipo masculino 46, XY sin anomalías cromosómicas de paciente 41.

## 11. Bibliografía

1. Rossell-Perry P, Nueva clasificación de severidad de fisuras labiopalatinas del programa outreach surgical center Lima, Perú. Acta Med 2006; 23(2) 59
2. Labio leporino y paladar hendido. NIH Institutos Nacionales de Salud. Disponible en:URL:<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/cleftlipandpalate.html>
3. Feroso de la fuente MA, Martínez JA, Bilbao JJ. Análisis de las características de los pacientes con fisura labio-palatina en la comunidad de Madrid. AFILAPA 2006 Dic
4. Del campo M. Pérez J, García L, Delicado A, Quero Jiménez J. CATCH-22: Implicaciones actuales de la microdelección en 22q11. Ann Esp Pediatr 1996;45:341-345
5. Zarante I, Chrgnco L, López C, Fernández N. Frecuencia de malformaciones congénitas: evaluación y pronóstico de 52.744 nacimientos en tres ciudades colombianas. *Biomédica* 2010;30:65-71
6. Friedman MA, Mileta N, Roe C, Wang D, Morrow BE, Kates WR, Higgins AM and Shprintzen RJ. Cleft palate, retrognathia and congenital heart

- disease in velo-cardio-facial syndrome: A phenotype correlation study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011(139): 45-52
7. Aracena A. Mariana. Cardiopatías congénitas y síndromes malformativos-genéticos. *Rev. chil. pediatr.* 2003. 74(4): 426-431. (No entiendo esta cita)
  8. M. Bueno, J. M. Pérez-González y O. Bueno. El cromosoma humano 22. Canarias  
Pediátrica, 2000; 24: 17-22
  9. Miller KA. FISH Diagnosis of 22q11.2 Deletion Syndrome. *Newborn and Infant Nursing Reviews* 2008 3;8(1):e11-e19
  10. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA et al. A Population-Based Study of the 22q11.2 Deletion: Phenotype, Incidence, and Contribution to Major Birth Defects in the Population. *Pediatrics* 112 1 2003 y el año, las páginas?
  11. Scambler PJ: The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet* 2000, 9(16):2421-2426.
  12. TBX gene family. Genetics Home Reference. A service of the US National Library of Medicine. Disponible en: URL <http://ghr.nlm.nih.gov/geneFamily/tbx>
  13. McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 Deletion Syndrome. *GENEReviews* 2005
  14. Muñoz CS, Garay GF, Flores CI, Heusser RF, Talesnik GE, Aracena AM et al. Heterogeneidad de la presentación clínica del síndrome de microdelección del cromosoma 22, región q11. *Rev. méd. Chile.* 2001. (129): 5-9
  15. Escribano G, Castillo S. , Daher V , Salazar S, Tobella L. Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio Citogenético. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 2009; 20: 20 – 7
  - 16 M.F. Arlt, A.M. Casper and T.W. Glover..Common fragile sites. *Cytogenetic and genome research.* 2006, 232(1):4-12
  17. Iniesta R, Guino E, Moreno V: Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit* 2005, 19(4):333-341.
  18. Halder A' , Jain M , Kabra M, Gupta N. Mosaic 22q11.2 microdeletion syndrome: diagnosis and clinical manifestations of two cases. *Molecular Cytogenetics* 2008, 1:18