

Evaluación citogenética y de pérdida de la heterocigosidad de la región 22q11.2 en pacientes con el síndrome de DiGeorge

Germán Andreo Gallego García¹, Claudia Milena Trujillo Vargas², Carlos Guillermo Garcés Samudio³,
Carlos Mario Muñetón Peña⁴, Julio César Orrego Arango⁵, José Luis Franco Restrepo⁶

RESUMEN

Objetivo: evaluar la utilidad de la PCR para marcadores microsatélites (PCR-STR) en la región 22q11.2 en el ADN genómico, para identificar microdeleciones en pacientes con síndrome de DiGeorge (SDG).

Materiales y Métodos: se hizo un análisis de las historias clínicas de tres niñas con SDG y se investigaron deleciones en el cromosoma 22q11.2 mediante FISH y PCR-STR.

Resultados: la FISH logró detectar deleciones en 22q11.2 en dos de las tres pacientes. Por su parte, por medio de la PCR-STR, se logró establecer que la paciente n.º 1 presentaba una deleción de 1,5 Mb proximal al centrómero, la segunda de mayor frecuencia en los pacientes con SDG. La deleción fue de origen paterno. Para caracterizar el defecto molecular en las otras pacientes, sería necesario acoplar estudios de cromatografía a este método, que permitan determinar el tamaño molecular de cada uno de los alelos parentales, o bien, ampliar este análisis con más microsatélites informativos ubicados en la región 22q11.2 para así definir más precisamente el tamaño de la deleción.

Conclusiones: la PCR-STR en el ADN genómico es una alternativa para identificar deleciones que afectan microsatélites en la región 22q11.2 a un menor costo que la FISH y con resultados más rápidos; al mismo tiempo permite definir el origen parental y el tamaño de la microdeleción. Esta información es valiosa para identificar los genes asociados con las características clínicas del síndrome.

PALABRAS CLAVE

Inestabilidad de Microsatélites; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Síndrome de DiGeorge

¹ Estudiante de Pregrado, Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Investigadora Asociada, Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Pediatra Infectólogo, Grupo de Investigación Pediciencias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁴ Investigador Asociado, Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁵ Investigador Asociado, Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁶ Director, Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Claudia Milena Trujillo; cmtrujj@hotmail.com

Recibido: septiembre 27 de 2010

Aceptado: enero 24 de 2011

SUMMARY

Cytogenetic evaluation and loss of heterozygosity of chromosome 22q11.2 in patients with the DiGeorge syndrome

Objective: To evaluate the usefulness of PCR for microsatellite markers (PCR-STR) in the 22q11.2 region of the genomic DNA in order to identify microdeletions in patients with the DiGeorge syndrome (DGS).

Methodology: Clinical information was obtained from the medical charts of three DGS patients. Deletions in the chromosomal region 22q11.2 were investigated using FISH and PCR-STR.

Results: We detected 22q11.2 deletions in two of the patients using FISH. Through PCR-STR, we identified the centromere-proximal 1.5 Mb deletion in patient n.º 1, the second most common defect in DGS. This deletion was of paternal origin. In order to better characterize the molecular defect in the other two patients included in this study, chromatographic analyses should be coupled to the PCR-STR. This would allow more accurate determination of the molecular weight of each parental allele. Also, more microsatellite markers in the 22q11.2 region should be analyzed to better define the deletion size.

Conclusions: PCR-STR using the genomic DNA is a good alternative to identify deletions affecting microsatellites in the 22q11.2 region. In comparison to FISH, the PCR-STR is easy to carry out, less expensive and equally reliable in the detection of typical deletions. PCR-STR also allows to determine the parental origin and the deletion size, a valuable information to identify genes associated with the clinical manifestations of this syndrome.

KEY WORDS

Microsatellite Instability; Polymerase Chain Reaction; DiGeorge Syndrome

INTRODUCCIÓN

El síndrome de DiGeorge (SDG) es una anomalía congénita compleja que resulta de deficiencias en la migración, diferenciación y señalización de las

células de la cresta neural durante la cuarta a octava semanas del desarrollo embrionario (1). Su incidencia se calcula en 1:4.000 a 1:6.000 nacidos vivos; afecta por igual a hombres y mujeres (2,3).

El SDG se diagnostica clínicamente con base en la identificación de la tríada de cardiopatía congénita, hipoplasia o aplasia del timo (asociada a inmunodeficiencia) e hipoparatiroidismo con hipocalcemia neonatal. No obstante, es frecuente observar dismorfismo facial y alteraciones funcionales en el paladar (disfunción velofaríngea, insuficiencia velopalatina) o en otros órganos (agenesia o displasia renal, anomalías oftalmológicas y esqueléticas, retardo en la erupción o hipoplasia del esmalte dental, problemas psiquiátricos) (4). La expresión de estas anomalías es variable y mientras algunas se informan hasta en el 100% de los pacientes, otras suelen ser esporádicas (2).

Entre las afecciones cardíacas y los defectos en los grandes vasos registrados en el SDG se incluyen la interrupción del arco aórtico, el tronco arterioso común, la atresia pulmonar y la tetralogía de Fallot; sin embargo, también se han reportado otros defectos cardíacos (2). El grado de hipoplasia del timo es variable y se detecta en aproximadamente el 80% de los pacientes (5), a menudo asociado a inmunodeficiencia celular con linfopenia y disfunción leve a moderada de linfocitos T, mientras que la aplasia tímica se observa solo en alrededor del 1% de los casos como una inmunodeficiencia grave combinada (6,7). La hipocalcemia se expresa clínicamente con espasmos musculares, problemas cardíacos e interrupciones en la función cortical por cambios repentinos, desorganizados o excesivos del nivel de calcio en las células cerebrales (8).

El SDG se asocia con alteraciones cromosómicas (microdeleciones) en el cromosoma 22q11.2 en el 85% a 90% de los pacientes, o en el 10q13 en aproximadamente 5% a 10% de los casos. La mayoría de las deleciones son *de novo*, con menos del 10% heredadas de uno de los dos padres. Sin embargo, en aproximadamente el 5% de los casos no es posible identificar las alteraciones genéticas asociadas (9). En 84%-90% de los pacientes con deleciones en el cromosoma 22q11.2 suelen identificarse deleciones "típicas" que tienen una longitud de aproximadamente 3 Mb y afectan al segmento genómico conocido como "región crítica de SDG" (RCD), localizada entre los LCR (por la sigla en

inglés de *low copy repeats*) A y D (figura n.º 1), mientras entre 7% y 14% de los casos corresponden a deleciones del mismo segmento pero de solo 1,5 Mb y proximales al centrómero entre los LCR A y B (figura n.º 1) (9-11). No obstante, en la RCD se han descrito deleciones que van desde los 0,6 Mb hasta los 1,5 Mb distales al centrómero (11), así como en las regiones adyacentes a la 22q11.2 y otras que se superponen a la RCD y sus regiones adyacentes, con longitudes que varían entre 3 Mb y 4 Mb y que se denominan "atípicas" (12). Además, a menudo no es posible establecer una correlación entre el genotipo y el fenotipo porque algunos pacientes con deleciones grandes presentan un fenotipo menos grave que los pacientes con microdeleciones, una característica también observada en los pacientes con deleción en la región 10p13 (13).

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por la sigla en inglés de *fluorescent in situ hybridization*) es la técnica más usada para identificar las deleciones en el cromosoma 22q11.2; consiste en tomar una muestra de sangre total del paciente para luego hibridar el material genético de las células con dos sondas fluorescentes de distintos colores que permiten tanto la identificación del cromosoma 22 (sonda 1) como la detección de deleciones hemicigotas en la RCD (sonda 2). Para lograr este objetivo, es importante inducir la proliferación celular en cultivo de linfocitos de sangre periférica mediante un mitógeno, para luego bloquear la división celular y la segregación de los cromosomas y obtener las metafases; sin embargo, la técnica también se puede hacer en células en interfase. Debido a que el proceso de la FISH puede tomar varios días y requiere cultivos así como un microscopio de fluorescencia y un observador entrenado para la identificación apropiada de las señales provenientes de las sondas, en años recientes se ha venido empleando la técnica de PCR (por la sigla en inglés de *polymerase chain reaction*) para la amplificación de marcadores microsatélites (PCR-STR, por la sigla en inglés de *short tandem repeats*) en diferentes enfermedades causadas por alteraciones cromosómicas (14,15) lo cual permite también determinar la pérdida de heterocigocidad y, además, establecer en muchos casos el origen parental y el tamaño de la deleción. Esta técnica es muy reproducible y eficiente y se efectúa en menor tiempo y a un costo más bajo que la FISH (16).

El presente estudio tuvo como objetivo hacer una prueba piloto para comparar la FISH con la PCR-STR en la RCD, y determinar la posibilidad de hacer diagnóstico molecular del defecto en forma más rápida y efectiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se efectuó en tres pacientes con diagnóstico de SDG establecido mediante la revisión de historias clínicas y el examen físico. Los datos se consignaron en un formato que incluyó: edad, sexo, número y tipo de infecciones y hospitalizaciones, presencia de enfermedades congénitas en familiares y causas de muerte. El estudio contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Sede de Investigaciones Universitarias de la Universidad de Antioquia y con el consentimiento informado de los padres de cada paciente, siguiendo las normas internacionales (17).

Detección de microdeleciones en la región 22q11.2 mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en linfocitos de sangre periférica

Los núcleos en interfase se obtuvieron a partir de tres mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA, que se incubaron con 10 mL de solución hipotónica de KCl al 0,075 M a 37 °C durante 20 minutos para promover la lisis celular; posteriormente se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se procedió a fijar los núcleos con solución de fijación Carnoy (ácido acético-metanol, relación 1:3).

Para obtener núcleos en metafase, se tomó un mL de sangre anticoagulada, se diluyó en cinco mL de solución RPMI suplementada con suero fetal bovino al 10%, 200 µ/mL de penicilina y 200 µ/mL de estreptomina (RPMI completo) y se procedió a estimular las células con 20 µg/mL de fitohemaglutinina (Sigma Co, St Louis, MO). El cultivo se incubó durante 72 horas a 37 °C en 5% de CO₂, luego de lo cual se agregaron 140 µL de N-deacetil-N-metilcolchicina a una concentración de 10 µg/mL (Colcemid, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) incubando por 40 minutos adicionales a 37 °C en 5% de CO₂ con el propósito de inhibir la polimerización de los microtúbulos y, así, desensamblar el huso acromático lo que genera una parada del ciclo celular en metafase.

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente; luego se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron lentamente y se agregaron gota a gota 10 mL de solución hipotónica de KCl al 0,075 M precalentada para luego incubarlas a 37 °C por 20 minutos y así promover la lisis celular. Seguidamente se hizo una nueva centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se procedió a fijar los núcleos con 10 mL de solución de fijación Carnoy fría (-20 °C) aplicada gota a gota. Se incubó durante 10 minutos en hielo y se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La preparación de metafases se almacenó a -20 °C en solución de fijación.

En varios portaobjetos se aplicaron de manera uniforme tres gotas de la suspensión de los núcleos en interfase o metafase y se dejaron secar; las placas se almacenaron a -20 °C hasta realizar la hibridación *in situ* para lo cual

se emplearon las sondas SpectrumGreen™ LSI ARSA (que hibridan el gen Arilsulfatasa A, localizado en la región 22q13.3, Figura n.º 1) y SpectrumOrange™ LSI TUPLE I (que flanquea la región 3' no codificadora del gen TUPLE I y las regiones D22S553, D22S609 y D22S942, Figura n.º 1) (Vysis, Abbott Laboratories, Illinois, USA). La hibridación se llevó a cabo aplicando 10 µL de cada sonda y cubriendo inmediatamente la placa con un cubreobjetos, para incubar a 37 °C por 16-24 horas en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron a la placa 10 µL de colorante de contraste 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, por la sigla en inglés de *4-6-diamidino-2-phenylindol*) y se hizo la lectura en un microscopio de epifluorescencia, modelo Axyskop 2 dotado con un filtro triple (DAPI/Orange/Green) y con una cámara fotográfica CCD AxioCam MRc, (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemania). Se contaron más de 100 núcleos por paciente.

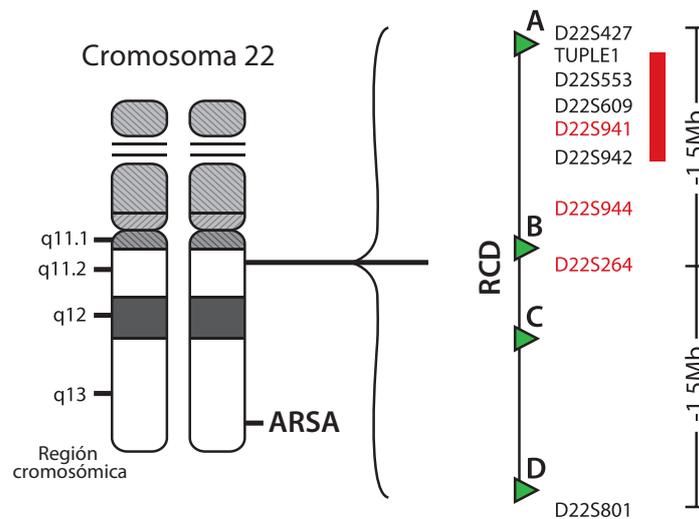


Figura n.º 1. Idiograma del cromosoma 22 que ilustra la región crítica de SDG (RCD)

A la izquierda se definen las regiones cromosómicas y a la derecha se ubican el gen ARSA y cada uno de los marcadores microsatélites de interés en este estudio situados en la región crítica del síndrome de DiGeorge (RCD) en 22q11.2. Los triángulos verdes y cada una de las letras A, B, C y D definen la ubicación de los LCR dentro de la RCD. El rectángulo naranja localiza la región reconocida por la sonda TUPLE 1, utilizada para identificar la delección de SDG por medio de FISH. Entre los microsatélites D22S427/D22S264 y D22S264/D22S801 hay una distancia de aproximadamente 1,5 Mb que delimita la RCD la cual tiene un tamaño aproximado de 3 Mb y se ubica entre los LCR A y D

PCR para microsatélites (PCR-STR) en la región 22q11.2

A partir de 3 mL de sangre total se hizo la extracción de ADN empleando el estuche PureGen para extracción de ADN de sangre total (PureGen Technology, CA)

siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se almacenó a 4 °C hasta su uso. Los ADN de pacientes, padres y controles se sometieron a PCR para amplificar los marcadores polimórficos D22S941, D22S944 y D22S264, ubicados en la RCD (figura n.º 1) empleando los siguientes *primers*: D22S941 = [F- GAG GTT ACA

AAG TAC ATT AAC TT], [R- CAA GAA ATG GTT GGA GCT GGT]; D22S944 = [F- CAT GTG AAA GAT GCT ACT TCC], [R- ATC CCA TGA TGC TCC TCC CCA T]; D22S264 = [F- ATT AAC TCA TAA AGG AGC CC], [R- CAC CCC ACC AGA GGT ATT CC]. Las PCR se hicieron en un termociclador Geneamp® PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, Massachusetts, USA) a partir de 50 ng de ADN genómico/individuo en un volumen total de 25 µL que contenía 10 pmol de cada *primer*, 4 nmol de deoxinucleótido trifosfato (dNTP) y 0,5 U de Taq polimerasa (Promega, Madison, Wisconsin, USA) en una solución tampón 1X de sulfato de amonio (Promega) bajo las siguientes condiciones: 16 mmol/L [NH₄]₂SO₄, 67 mmol/L Tris, pH 8,8, 0,1% Tween y 1,5 mmol/L MgCl₂ (Promega). Las condiciones de la PCR fueron como sigue: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 30 segundos), alineamiento (64,3 °C por 30 segundos para D22S944 y D22S941 y 62,9 °C para D22S264) y extensión (72 °C por 30 segundos) (15).

Para la resolución de las bandas, los productos de PCR se resolvieron por peso molecular en un gel de poliacrilamida al 7,5% y la visualización de las bandas se hizo mediante tinción con nitrato de plata. Los protocolos de tinción se han descrito previamente (18).

RESULTADOS

Antecedentes clínicos y características fenotípicas de los pacientes con diagnóstico de SDG

Las características fenotípicas de las tres niñas con diagnóstico de SDG se describen en la tabla n.º 1. Todas se diagnosticaron clínicamente durante los dos primeros meses de vida como SDG incompleto. Al momento de la caracterización fenotípica y genotípica, la paciente n.º 1 tenía seis años, la n.º 2, cinco años y la n.º 3, 10 meses de edad. Con respecto a los hallazgos de dismorfismo facial, se observó hipertelorismo en las tres pacientes, implantación baja del pabellón auricular en las pacientes n.º 1 y 2 y telecanal en la paciente n.º 3. Además, en la paciente n.º 1 se detectaron úvula bífida y paladar hendido con retardo del habla y en la n.º 2 se observó paladar duro ojival. En la paciente n.º 3 no se detectó ninguna anomalía en el sistema bucofaríngeo. En las pacientes n.º 1 y 2 se identificaron cardiopatías

troncoconales consistentes en interrupción del arco aórtico tipo B y comunicación interventricular con hipertensión pulmonar; en la otra paciente se identificaron transposición de grandes vasos, comunicación interauricular y ductus arterioso persistente. En las pacientes n.º 1 y 2 se obtuvo evidencia radiológica de sombra tímica reducida de tamaño. Las anomalías metabólicas en el período neonatal consistieron en hipocalcemia (pacientes n.º 1 y 2), hiperfosfatemia (paciente n.º 1) e hipokalemia (paciente n.º 1) (tabla n.º 1). Además, se registraron anomalías no descritas anteriormente en el SDG como la hernia crural (paciente n.º 2) y la parálisis facial periférica (paciente n.º 3).

FISH para la región 22q11.2

La técnica de FISH reveló una microdelección hemigigota en las pacientes n.º 1 y 2 en la región 22q11.2 (figura n.º 2, fotografías A y B). Considerando que el diagnóstico de SDG se basa casi exclusivamente en hallazgos clínicos y de laboratorio, estos dos casos se reclasificaron entonces como síndrome por delección de la región 22q11.2. En la paciente n.º 3 no se pudo detectar la delección con la sonda Tuple 1 incluso al analizar los núcleos en metafase (figura n.º 2, fotografía C). Considerando que esta sonda solo detecta delecciones proximales al centrómero dentro de la RCD, sería necesario, en el caso de la paciente n.º 3, complementar este estudio genético por FISH empleando sondas o marcadores que detecten delecciones en otras regiones de 22q11.2 y en otros cromosomas que también están asociados al SDG como el 10q13.

Confirmación de la microdelección cromosómica en la región 22q11.2 mediante PCR para marcadores polimórficos

Se ha propuesto la PCR para marcadores microsatélites como una alternativa para la FISH en SDG, porque puede también determinar con alto poder de resolución la pérdida de heterocigosidad de estos marcadores (15). Dado que esta prueba requiere el análisis del ADN de los padres para comparar los alelos paternos y maternos con los del paciente, no solamente se puede identificar este tipo de defectos cromosómicos y el tamaño de la delección, sino que también se puede definir el origen parental de esta cuando se sospeche segregación del defecto.

Para este análisis, evaluamos los marcadores polimórficos D22S941, D22S944 y D22S264 en las tres pacientes y en sus respectivos padres. En la paciente n.º 1 se observaron solo una banda para los dos primeros marcadores y dos bandas para el tercer marcador, en contraste con los padres, en quienes se observaron dos bandas en cada uno de los marcadores. Basados en el tamaño de las bandas se concluyó que la paciente heredó un alelo de cada

marcador microsatélite de su madre, pero no de su padre. Por lo tanto, la delección es de origen paterno. La paciente n.º 2 mostró una banda para cada uno de los marcadores, mientras que sus padres mostraron las dos bandas respectivas para cada marcador. La paciente n.º 3 presentó las dos bandas para los tres marcadores, la madre una sola banda para el marcador D22S944 y el padre una sola banda para el marcador D22S264 (figura n.º 3).



Figura n.º 2. FISH realizadas en las tres pacientes con diagnóstico de SDG. A partir de células mononucleares de sangre venosa periférica se obtuvieron núcleos en interfase o metafase que se hibridaron empleando las sondas ARSA y TUPLE-1 y se analizaron empleando un microscopio de epifluorescencia usando DAPI como colorante de contraste. Las flechas cerradas indican la señal fluorescente verde correspondiente a la sonda ARSA, mientras que las abiertas indican la señal fluorescente naranja de la sonda TUPLE 1. A y B. Células en interfase de las pacientes n.º 1 y 2, respectivamente. C. Células en metafase de la paciente n.º 3. Aumento: 1.000X

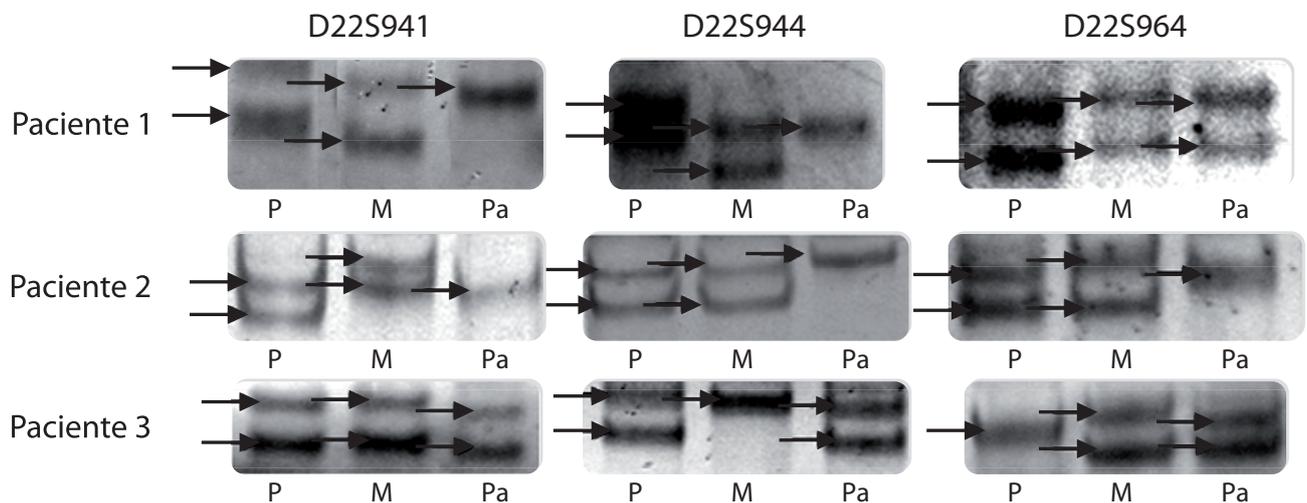


Figura n.º 3. Análisis molecular mediante PCR-STR de marcadores microsatélites contenidos en la RCD en pacientes con diagnóstico de SDG. Resultados de la electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con sulfato de plata de los fragmentos de PCR-STR obtenidos a partir del ADN genómico de las pacientes n.º 1, 2 y 3 y sus padres, para los marcadores polimórficos D22S941, D22S944 y D22S264. Las flechas indican las bandas para cada uno de los alelos detectados. P: padre; M: madre; Pa: paciente

En resumen, los resultados sugieren que la paciente n.º 1 es hemicigoto para los marcadores ubicados entre el LCR-A y LCR-B lo cual confirma el resultado de FISH para detectar la deleción. No obstante, en la paciente n.º 2, debido a que los padres presentaban alelos de un tamaño molecular similar para los tres marcadores

microsatélites evaluados, no fue posible definir si era homocigoto para los alelos de los microsatélites estudiados o presentaba la deleción. En la paciente n.º 3 no se observó la microdeleción porque es heterocigoto para cada marcador, un resultado que está de acuerdo también con los resultados del FISH.

Tabla n.º 1. Características fenotípicas de las pacientes con SDG evaluadas por el Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina

	Rasgos fenotípicos	Paciente n.º 1	Paciente n.º 2	Paciente n.º 3
Rostro	Hipertelorismo	X	X	X
	Telecanto		X	
	Implantación baja del pabellón auricular	X	X	
Sistema bucofaringeo	Úvula bífida	X		
	Paladar hendido	X		
	Paladar duro ojival		X	
	Retardo del habla	X		
Tipo de cardiopatía	Interrupción del arco aórtico tipo B	X	X	
	Comunicación interventricular	X	X	
	Hipertensión pulmonar	X	X	
	Transposición de grandes vasos			X
	Comunicación interauricular			X
	Ductus arterioso persistente			X
Glándulas	Hipoplasia del timo	X	X	
	Hipocalcemia	X	X	
Iones	Hiperfosfatemia	X		
	Hipokalemia	X		
	Hiperelasticidad articular		X	
Neurológico	Retardo psicomotor	X	X	
	Parálisis facial periférica			X
Otros	Hernia crural bilateral		X	
	Zonas de cabello hiperpigmentadas		X	
	Lesiones hipocrómicas		X	

X: presencia del defecto

DISCUSIÓN

Las aberraciones en la región 22q11 constituyen una de las alteraciones cromosómicas más comunes en humanos y llevan a fenotipos complejos que

las convierten en un problema de salud pública importante. Un diagnóstico temprano de la deleción 22q11 en niños con enfermedad cardiovascular congénita permite la detección rápida de las características no cardíacas asociadas para su

adecuado tratamiento como también para hacer una consejería genética apropiada.

En el presente estudio se hizo una caracterización citogenética y molecular de tres niñas diagnosticadas clínicamente con SDG incompleto. Cabe resaltar que a pesar de haber hecho el diagnóstico de SDG en los primeros meses de vida, las pacientes n.º 1 y 2 solo pudieron acceder a la caracterización citogenética y molecular del defecto a los seis y cinco años de vida, respectivamente. Esto se debe probablemente a que no se dispone de la prueba FISH para detectar defectos en SDG en casi ninguna de las entidades de salud del país. Por lo tanto, es muy importante diseñar estrategias de diagnóstico genético de SDG que sean rápidas, fáciles de efectuar y económicas para que faciliten los estudios genéticos para este síndrome.

La caracterización fenotípica detallada de las pacientes incluidas en este estudio reveló que las tres tenían los defectos cardíacos comúnmente asociados con el SDG y, lo que es importante, se identificaron dos anomalías que no habían sido informadas previamente en este síndrome: la hernia crural y la parálisis facial periférica. En las tres pacientes se buscaron microdeleciones en la región 22q11.2 mediante la técnica de FISH pero solo en las pacientes n.º 1 y 2 se encontró la microdelección por esta técnica; entonces, de acuerdo con la nomenclatura actualmente empleada, estos dos casos se reclasifican como pacientes con síndrome por delección en la región 22q11.2. Los padecimientos en la paciente n.º 3 se siguen denominando SDG hasta que se detecte su causa genética. Debido a que la sonda Tuple 1 solo detecta deleciones proximales al centrómero dentro de la región crítica del SDG, es necesario complementar este estudio genético empleando otras sondas o marcadores que detecten deleciones en regiones distales y adyacentes y en otros cromosomas que también están asociadas a SDG. Según lo propuesto como alternativa al uso de FISH, la PCR para amplificar marcadores microsatélites puede identificar los defectos genéticos en el SDG y revelar el origen parental y el tamaño de la delección. En un estudio llevado a cabo con PCR empleando los marcadores D22S941 y D22S944 ubicados entre los LCR-A y -B, y el marcador D22S264 ubicado entre LCR-B y -C, Pereira y colaboradores (15) definieron índices de heterocigosidad para estos tres marcadores (D22S941 y D22S944 con cinco alelos y D22S264 con

seis alelos) de 70,8%, 80,4% y 70,4%, respectivamente. Basados en estos datos, los autores calcularon que la PCR-STR usando estos tres marcadores polimórficos tendría un 98% de especificidad para detectar los defectos genéticos en 22q11. En el presente estudio se amplificaron estos microsatélites en ADN de tres pacientes con diagnóstico de SDG y en sus padres. Debido a que el tamaño de las bandas le restó informatividad a los alelos, para la paciente n.º 2 es necesario ampliar el estudio con más microsatélites informativos ubicados en la región 22q11.2, o bien acoplar a este método estudios de cromatografía, que permitan determinar con mayor exactitud el tamaño molecular de cada uno de los alelos parentales y así definir el tamaño de la delección. Para la paciente n.º 3 también sería importante ampliar el estudio genético en 22q11.2 con más microsatélites ubicados distales al centrómero y entre los LCR B, C y D, para definir si presenta una de las deleciones atípicas en SDG. Sin embargo, mediante esta técnica de PCR se logró establecer que la paciente n.º 1 presentó la segunda delección de mayor incidencia en el SDG (delección de 1,5 Mb proximal al centrómero, dentro de la RCD).

Es importante también anotar que la paciente n.º 3 en quien no se pudieron detectar alteraciones en la región cromosómica 22q11 ni por FISH, ni por PCR-STR, se diferencia clínicamente de las otras dos pacientes, pues no presenta alteraciones en el sistema bucofaríngeo ni en el timo, ni había evidenciado defectos neurológicos o alteraciones iónicas que pudieran sugerir un defecto en la glándula paratiroides. Además, sus defectos cardíacos eran diferentes a los de las pacientes n.º 1 y 2. Aunque se ha demostrado que es difícil hacer una correlación genotipo/fenotipo en el SDG, nuestro estudio enfatiza la necesidad de efectuar el diagnóstico genético y establecer el tamaño de la delección en el SDG. Esta información podría contribuir de manera importante a definir los diferentes genes implicados en las diversas manifestaciones clínicas en SDG.

Proponemos entonces el uso de la PCR-STR como ayuda diagnóstica para rastrear deleciones en la región 22q11.2 en pacientes con evidencia clínica de SDG. Ampliando el número de microsatélites evaluados y adaptando esta técnica a métodos cromatográficos que permitan definir con mayor exactitud los alelos presentes tanto en los padres como en los pacientes

sospechosos, la PCR-STR podría ser una alternativa más fácil, más económica e igualmente confiable para los estudios genéticos en SDG además de permitir caracterizar el origen parental y el tamaño de las deleciones en comparación con el FISH, que en estos momentos es el estándar de oro para los estudios genéticos en este síndrome.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores manifiestan no tener conflictos de interés relacionados con la presente publicación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hutson MR, Kirby ML. Neural crest and cardiovascular development: a 20-year perspective. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 Feb;69(1):2-13.
- Sullivan KE. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;4(6):505-12.
- Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet*. 1999 Apr;64(4):1076-86.
- McDermid HE, Morrow BE. Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet*. 2002 May;70(5):1077-88.
- Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*. 2004 Feb;103(3):1020-5.
- Aglony M, Lizama M, Méndez C, Navarrete C, Garay F, Repetto G, et al. [Clinical findings and immunologic variability in 9 patients with DiGeorge syndrome]. *Rev Med Chil*. 2004 Jan;132(1):26-32.
- Al-Tamemi S, Mazer B, Mitchell D, Albuquerque P, Duncan AMV, McCusker C, et al. Complete DiGeorge anomaly in the absence of neonatal hypocalcemia and velofacial and cardiac defects. *Pediatrics*. 2005 Sep;116(3):e457-60.
- Taylor SC, Morris G, Wilson D, Davies SJ, Gregory JW. Hypoparathyroidism and 22q11 deletion syndrome. *Arch Dis Child*. 2003 Jun;88(6):520-2.
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1997 Sep;61(3):620-9.
- Boyd LJ, Livingston JS, Brown MG, Lawce HJ, Gilhooly JT, Wildin RS, et al. Meiotic exchange event within the stalk region of an inverted chromosome 22 results in a recombinant chromosome with duplication of the distal long arm. *Am J Med Genet A*. 2005 Nov;138(4):355-60.
- 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 Jan;7:18.
- 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 Nov;42(11):871-6.
- Gottlieb S, Driscoll DA, Punnett HH, Sellinger B, Emanuel BS, Budarf ML. Characterization of 10p deletions suggests two nonoverlapping regions contribute to the DiGeorge syndrome phenotype. *Am J Hum Genet*. 1998 Feb;62(2):495-8.
- Crkvenac-Gornik K, Grubić Z, Stingl K, Muzinić D, Brkljacić-Kerhin V, Begović D. Rapid prenatal diagnosis of numerical aberrations of chromosome 21 and 18 by PCR-STR method. *Coll Antropol*. 2007 Sep;31(3):859-62.
- Pereira AC, Corrêa RFR, Mota GF, Kim CA, Mesquita SF, Krieger JE. High specificity PCR screening for 22q11.2 microdeletion in three different ethnic groups. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Oct;36(10):1359-65.
- Jalali GR, Vorstman JAS, Errami A, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, et al. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat*. 2008 Mar;29(3):433-40.
- Bankowski Z, Levine RJ. Ethics and Research on Human Subjects. *International Guidelines: Proceedings of the XXVIth CIOMS Conference (CIOMS Round Table Conference)*. World Health Organization; 1993.
- Stothard JR, Frame IA, Miles MA. An evaluation of four staining methods for the detection of DNA in nondenaturing polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1997 Nov;253(2):262-4.