



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Defectos genómicos en cardiopatías congénitas

*Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área Ciencias Biológicas*

Marisol Delea

Directora de Tesis: Dra Liliana Dain

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iusem

Lugar de Trabajo: Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM) “Dr.
Eduardo Castilla”, ANLIS

Fecha de defensa: 19 de diciembre del 2023

Buenos Aires, octubre 2023

DEFECTOS GENÓMICOS EN CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

RESUMEN

Es sabido que en la actualidad las enfermedades con base total o parcialmente genética constituyen un problema para la salud pública y ocupan en nuestros días un lugar cada vez más preponderante en la agenda sanitaria mundial y nacional. De hecho, las anomalías congénitas (AC) en nuestro país presentan una prevalencia de 1.82% según datos de la Red Nacional de Anomalías Congénitas (RENAC). En esta prevalencia no se incluyen los impedimentos fisiológicos y mentales de aparición más tardía, aunque se estima que la prevalencia asciende al 8% a los 5 años de edad. Las AC en la Argentina representan la segunda causa de mortalidad infantil y explican el 27.94% de las defunciones al nacimiento. Dentro de las AC, las cardiopatías congénitas (CC) son las más frecuentes y constituyen un tercio de estas entidades.

Las CC abarcan un amplio espectro de entidades que poseen anomalías en la estructura del corazón y los grandes vasos, poseen una prevalencia mundial que oscila entre 6 y 9 de cada 1000 nacimientos y se destacan como causa de muerte prenatal, neonatal e infantil y de morbilidad en edad pediátrica. En el periodo comprendido entre 2009 - 2018, fueron reportados al Registro Nacional de Malformaciones Congénitas niños con CC, con una prevalencia de 4.92 de cada 1000 nacimientos.

La etiología de la mayor parte de las CC es multifactorial, en donde intervendrán tanto factores ambientales como genéticos. Pueden ocurrir en el contexto de malformaciones múltiples o, como en la mayoría de los casos, de forma aislada y tanto para los casos sindrómicos como para los aislados se ha reportado recurrencia familiar, consistente con la influencia genética en el desarrollo de la patología. La contribución genética a la causalidad de la patología es diversa y abarca desde aneuploidías cromosómicas hasta defectos en genes individuales.

En este trabajo nos propusimos la identificación y el análisis de desbalances genómicos y de variantes de secuencias en individuos afectados con CC con el fin de contribuir a la caracterización de nuestra población y a la comprensión de los mecanismos involucrados en la patogenia.

En total, se reclutaron 334 pacientes de hasta 16 años de edad con CC ya sea en forma aislada o con otras anomalías mayores. En una primera etapa, se incluyó un grupo de pacientes con CC conotroncales (n=80). Avanzando con el trabajo de tesis, ampliamos la inclusión a pacientes que presentaban todo tipo de CC (n=254). Los pacientes incluidos en la primera etapa fueron estudiados mediante técnicas de citogenética clásica, hibridación fluorescente in situ (FISH) para la región 22q11 y un análisis por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) de regiones genómicas asociadas a CC conotroncales. Aquellos pacientes que no presentaron ninguna anomalía mediante las metodologías anteriores fueron estudiados en búsqueda de variantes de secuencia en el gen *NKX2-5* por secuenciación de Sanger. Para el segundo grupo de muestras, y luego de analizar la posible presencia de la delección 22q11 (Del22q11) en pacientes con CC conotroncales y en pacientes con diagnóstico presuntivo de Síndrome de DiGeorge mediante MLPA, se implementó la búsqueda de desbalances genómicos mediante hibridación genómica comparada (array-CGH) en pacientes con al menos otra anomalía mayor. Finalmente, en un grupo seleccionado de pacientes analizamos la presencia de variantes de secuencia en un conjunto de genes implicados en CC mediante técnicas de secuenciación masiva de nueva generación. Los análisis previamente descritos se realizaron en 236 pacientes del total de pacientes incluidos.

Nuestros resultados mostraron la ausencia de anomalías cromosómicas detectables por estudios citogenéticos clásicos en la muestra analizada. Un total de 42 pacientes presentaron desbalances detectado por MLPA: 35 con Del22q11 de 3Mb, 3 con Del22q11 de 1.5 Mb, 2 con duplicaciones en 22q11, 1 con una delección en *TBX1* y 1 con una delección en 17p13.3. Entre los 44 pacientes analizados por array-CGH, se detectaron 10 anomalías de relevancia clínica en 9 pacientes, 7 delecciones, 2 duplicaciones -en un rango que abarcan entre 0.02 hasta 13 Mb- y 1 trisomía. Los estudios de secuenciación del gen *NKX2-5* no revelaron la presencia de variantes patogénicas, si bien se hallaron 3 variantes novedades (NM_004387.4: c.334+618G>A, c.450C>A y c.921G>T) que podrían corresponder a polimorfismos poblacionales. Finalmente, para 17 pacientes se realizó secuenciación masiva, entre los cuales 11 presentaron 12 variantes de significancia clínica o posible relevancia clínica relacionadas a CC. Siete de estas variantes ya habían sido reportadas previamente en la literatura: *VEGFA*: c.103G>T; *MYH7*: c.2599G>A; *PTPN11*: c.1381G>A; c.922A>G y c.181G>A; *MYBPC3*: c.2176C>T; *RAF1*: c.770C>T. Los 5 restantes, se describen por primera vez en este trabajo: *MYH6*: c.5276A>G; *MYH11*: c.3143-2_3145delAGTGC, *EP300*: c.7081C>T, *KAT6B*: c.4572_4573dupTA y *MYH7*: c.671A>T.

En resumen, por medio de estos algoritmos de análisis genético que combina tanto la aproximación clínica como los estudios de laboratorio, hallamos la causa genética de la afección en 61 de los 236 pacientes (25.84%) en los que fue posible realizar algún estudio. Los desbalances en 22q11 se hallaron en el 20.5% de los pacientes con CC conotroncales o con SDG analizados. El porcentaje de resolución de la causalidad genética del array-CGH fue del 20.9% y la de la secuenciación masiva 64.7%.

Todos estos resultados contribuyen al conocimiento de las causas moleculares involucradas en la CC a nivel global, pero tiene más relevancia al ser un trabajo pionero en nuestro país al abordar el análisis de la posible contribución genética en la afección en forma integral. Asimismo, se han detectado por primera vez a nivel mundial variantes de secuencia de relevancia clínica que estarían implicadas en las CC en individuos de nuestra población, y se ha avanzado en la implementación de metodologías genómicas en instituciones públicas del país.

Palabras clave: Cardiopatías congénitas; delección 22q11; variantes de número de copia; variantes de un solo nucleótido.

GENOMIC DEFECTS IN CONGENITAL HEART DEFECTS

ABSTRACT

It is well documented that diseases with a totally or partially genetic basis constitute a problem for public health and occupy an increasingly and importantly place in the global and national health agenda. In our country, congenital anomalies (CA) have a prevalence of 1.82% according to the National Network of Congenital Anomalies (RENAC). This prevalence may increase up to 8% at 5 years of age if physiological and mental impairments of later onset symptoms are considered. CA represents the second-leading cause of infant mortality and explains 27.94% of deaths at birth. Among CA, congenital heart diseases (CHD) are the most frequent type, representing a third of them.

CHD includes a broad spectrum of clinical presentations affecting the structure of the heart and great vessels. With a worldwide prevalence ranging from 6 to 9 out of every 1000 births, CHD stands out as one of the main causes of prenatal, neonatal, and infant death and morbidity in the pediatric age. Between 2009 and 2018, children with CHD were reported to RENAC with a prevalence of 4.92 per 1000 births.

The etiology of these defects is widely recognized as multifactorial, involving both environmental and genetic factors. They can occur in the context of multiple malformations or, most commonly, in isolation. Familial recurrence has been reported for both syndromic and isolated cases, consistent with genetic influence in the development of the disease, ranging from chromosomal anomalies to defects in single genes.

In this work we aimed to analyze the presence of genomic imbalances and sequence variants in individuals affected with CHD in order to contribute to the characterization of our population and to obtain a better understanding of the mechanisms involved in its pathogenesis.

We recruited a total of 334 patients of up to 16 years of age with isolated CHD or with other major abnormalities. In an initial step, we included a group of patients with conotruncal CHD (n=80) for its analysis. Moving forward, we expanded the inclusion criteria to patients who presented all types of CHD (n=254). Patients included in the initial step were analyzed by classical cytogenetic techniques, fluorescence in situ hybridization (FISH) for the 22q11 region, and MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) of genomic regions associated with conotruncal CHD. Samples with negative results were further studied by

Sanger sequencing of the *NKX2-5* gene. For the second group, patients with at least one other major anomaly were analyzed by array comparative genomic hybridization (array-CGH) after performing MLPA in samples of patients presenting conotruncal CHD or DiGeorge Syndrome. Finally, we analyzed the presence of genetic variants using massive next generation sequencing (NGS) in a selected group of patients. In total, 239 samples were successfully analyzed using the above-mentioned studies.

Our results showed the absence of chromosomal abnormalities by classical cytogenetic studies. A total of 42 patients presented imbalances detected by MLPA: 35 have a Del22q11 of 3Mb, 3 presented a shorter Del22q11 of 1.5 Mb, 2 have a 22q11 duplication, 1 has a deletion in *TBX1* and 1 has a deletion in 17p13.3. Among the 44 patients analyzed by array-CGH, we detected 10 clinically relevant anomalies in 9 patients, 7 deletions, 2 duplications - ranging from 0.02 to 13 Mb- and a trisomy. Non-pathogenic variants were found after sequencing the *NKX2-5* gene. In particular, we described 3 novel variants (NM_004387.4: c.334+618G>A, c.450C>A, c.921G>T) that probably represent population polymorphisms. Finally, massive sequencing was performed for 17 patients, and in 11 of them, we found 11 clinically relevant genetic variants related to CHD. Seven of these genetic variants had already been reported: *VEGFA*: c.103G>T; *MYH7*: c.2599G>A; *PTPN11*: c.1381G>A; c.922A>G y c.181G>A; *MYBPC3*: c.2176C>T; *RAF1*: c.770C>T, whereas the other 4 are being described for the first time in this work: *MYH6*: c.5276A>G; *MYH11*: c.3143-2_3145delAGTGC, *EP300*: c.7081C>T, *KAT6B*: c.4572_4573dupTA y *MYH7*: c.671A>T.

In conclusion, using these algorithms that combine laboratory techniques with clinical and genetic assessment, we determined the genetic contribution to CHD in 61 out of the 236 (23.11%) analyzed patients. Imbalances in 22q11 were found in 20.5% of the patients with conotruncal CHD or with DGS. The resolution yield of array-CGH was 20.9%, while 64.7% of the patients presented a clinically relevant genetic variant after applying NGS.

All these results may contribute to the knowledge of the molecular basis involved in CHD, although it becomes more relevant as a pioneering work by addressing the genetic contribution to the disease following an integral approach. Moreover, clinically relevant genetic variants implicated in CHD have been described for the first time worldwide in individuals from our population, and significant progress has been achieved in the implementation of genomic analysis in public institutions in our country.

Keywords: Congenital heart defects; 22q11 deletion; copy number variations; single nucleotide variants.

AGRADECIMIENTOS

A Lili que desde el primero al último día acompañó (con acento) mi ansiedad y dislexia maximizando su plasticidad neuronal, gracias por darme la oportunidad, por enseñarme, por valorarme, acompañarme y contenerme en el laboratorio y en la vida.

A Noe con quien me maravillé con mi primer salting out, y quien siempre me acurrucó cuando llegaba a la mañana con la vida escurriéndose por los ojos. Valor!!!

A Sandra, siempre construyendo y diciéndonos con amor cuánto crecemos cuanto valemos y envalentonados a seguir haciéndolo.

A mi mama Claudia que cuando el viento sopló fuerte, siempre estuvo ahí para cerrar las ventanas y mantenernos en pie con el amor más grande que hay.

A mi mejor amigo, compañero de vida, cómplice y movio Juan que me amo, mimo, cuido y alimento (claramente por demás) todos estos años, qué suerte encontrarte.

A mis hermanas y pri que me enseñaron a trabajar en equipo antes que nadie, mi primer grupo feminista sin saberlo, si tocan a una nos tocan a todas.

A mi abuela Lidya que siempre acompañó y aportó para mi crecimiento, siempre demostrando su orgullo, me hace sentir la científica más importante.

A mis amigxs, compañxs y psicologxs Lu, Lau, Eugo, Ani por las horas de tolerancia, los consejos, la empatía y la paciencia para escuchar pensar y ayudar a procesar la vida..., las admiro por sus diversas capacidades, son mis mantitas de apego, la razón a la que acudo antes de perder la razón.

A mi compañera de vida Clara con quien crecimos nos construimos y de-construimos juntas con mucho amor por casi 30 años ya, te amo sos un orgullo para mi y quiero tenerte conmigo siempre.

A mis amigas y compañeras de laboratorio Mel, Lu, Tani, Pao y Aldy que con amor y risas alegran los días, son el mejor equipo, el más humano divertido, con más empatía y mejor onda que hay.

A mis amigos y ex compas de labo Ceci y Karlis may the force be with you.

A mis amigas de la facu Ailu, Meri, Ichu, Delfi, Maca y Maru por las horas de estudio, los viajes las salidas con amor y risas, gracias por completarme como bióloga en todas sus dimensiones.

A mis amigas del colegio Fer, Clars, Kari, Juli y Mer por una vida de risas y por querernos siempre a pesar de todo a lo largo de los años.

A mi nueva familia sureña del laboratorio Carlis, Guille, Sole, Poly y Sabri que me adoptaron y cuidaron desde que llegue, son lo mas lindo de calafate.

A todos los pacientes y trabajadores de sistema de salud que contribuyeron en este trabajo tantos años con muestras, con mi formación, con información, ideas, correcciones y otras yerbas (sobre todo yerba).

Gracias.

A mi mamá, Claudia

Índice

-CAPÍTULO I-	INTRODUCCIÓN	15
I.1	ANOMALÍAS CONGÉNITAS	2
I.2	CORAZÓN NORMAL	3
I.2.1	Circulación postnatal	4
I.2.2	Circulación fetal	5
I.2.3	Desarrollo anatómico del corazón	6
I.2.4	Factores paracrinos y endocrinos determinantes de la morfogénesis del corazón	9
I.3	CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS	16
I.3.1	Generalidades y epidemiología	16
I.3.2	Clasificaciones de las cardiopatías congénitas	18
I.3.2.1	Clasificación clínica	18
I.3.2.2	Clasificación según mecanismos de patogénesis	18
I.3.2.2.1	Migración de tejido mesenquimal	20
I.3.2.2.2	Hemodinamia cardiaca	22
I.3.2.2.a	Mecanismos de alteración de la hemodinamia	22
I.3.2.2.b	Cardiopatías causadas por alteraciones en la hemodinamia.	22
I.3.2.2.3	Muerte Celular	23
I.3.2.2.4	Defectos de la matriz extracelular	24
I.3.2.3	Clasificación genérica	25
I.4	ETIOLOGÍA DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS	26
-CAPÍTULO II-	MARCO TEÓRICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
II.1	MARCO TEÓRICO	35
II.2	HIPÓTESIS	37
II.3	OBJETIVOS	37
II.3.1	Objetivo General	37
II.3.2	Objetivos Específicos	37
-CAPÍTULO III-	MATERIALES Y MÉTODOS	38
III.1	ASPECTOS ÉTICOS	39
III.2	MUESTRAS	39
III.2.1	Grupo A	39
III.2.2	Grupo B	41
III.3	TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	44
III.3.1	Extracción de sangre	44
III.3.2	Extracción de líquido amniótico	44
III.4	EXTRACCIÓN DE ADN	44

III.4.1 De sangre periférica	44
III.4.2 De líquido amniótico	45
III.5 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y DE FISH	46
III.6 ESTUDIOS DE <i>MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION</i> (MLPA)	47
III.6.1 Fundamentos de la técnica	47
III.6.2 Metodología	47
III.7 ANÁLISIS DE VARIANTES EN GENES Y REGIONES DE INTERÉS	50
III.7.1 Amplificación por PCR	50
III.7.1.1 Regiones de interés para posterior secuenciación	50
III.7.1.2 Amplificación de VNTRs	52
III.7.2 Purificación de los fragmentos de PCR para secuenciación	53
III.7.3 Secuenciación de Sanger	53
III.7.4 Purificación con etanol del producto secuenciado	54
III.7.5 Electroforesis Capilar	54
III.7.5.1 Electroforesis Capilar-Secuenciación de Sanger	54
III.7.5.2 Electroforesis Capilar-VNTRs	55
III.7.6 Análisis de resultados de electroforesis capilar	55
III.8 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA CON MICROARREGLOS DE ADN (ARRAY-CGH)	56
III.8.1 Fundamentos de la técnica	56
III.8.2 Cuantificación y análisis de calidad del ADN	56
III.8.3 Digestión enzimática de las muestras de ADN	57
III.8.4 Marcado fluorescente de las muestras	58
III.8.5 Hibridación	59
III.8.6 Lavado	60
III.8.7 Análisis	61
III.9 SECUENCIACIÓN MASIVA (SM)	62
III.9.1 SM Laboratorio húmedo	63
III.9.2 SM Laboratorio seco	63
III.9.3 SM Priorización de variantes	64
III.9.4. Validación de la/las variante/s clasificada/s como clínicamente relevante/s:	65
III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	66
-CAPÍTULO IV - RESULTADOS	67
IV.1. GRUPO A	68
IV.1.1 (GRUPO A): Descripción del grupo de pacientes estudiados	68
IV.1.2 (GRUPO A) Estudios realizados para los pacientes con CCC	69

IV.1.3 (GRUPO A) Pacientes con CCC en quienes detectamos desbalances genómicos	70
IV.1.4 (GRUPO A) Análisis de la presencia de desbalances genómicos en los pacientes con CCC	75
IV.1.5 (GRUPO A) Secuenciación del gen NKX2-5	78
IV.1.6 (GRUPO A) Análisis del caso SA13	80
IV.2.1 (GRUPO B) Tipos de Cardiopatías estudiadas/ Análisis del universo muestral/ Descripción del grupo de pacientes estudiados	83
IV.2.2 (GRUPO B) Estudios realizados para los pacientes	86
IV.2.2.1 (GRUPO B) Análisis de la presencia de anomalías genómicas en los pacientes mediante la técnica de MLPA	87
IV.2.2.2 (GRUPO B) Análisis de VNTRS para la muestra PID 100H1	95
IV.2.2.3 (GRUPO B) Análisis de microarreglos de ADN por hibridación genómica comparada (array-CGH)	95
IV.2.2.4 (GRUPO B) Análisis de secuenciación masiva (SM)	95
IV.2.3 (GRUPO B): Relación genotipo fenotipo para los desbalances genómicos hallados por array-CGH y para variantes de secuencia de relevancia clínica por SM.	102
-CAPÍTULO V- DISCUSIÓN	131
-CAPÍTULO VI- CONCLUSIONES, LIMITACIONES Y RELEVANCIAS	151
VI.1 CONCLUSIONES	152
VI.2 LIMITACIONES	154
VI.3 RELEVANCIA	154
-CAPÍTULO VII- BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXO I	184
ANEXO II	191
ANEXO III	196
ANEXO IV	199
ANEXO V	210

Resultados parciales de esta tesis formaron parte de las siguientes publicaciones científicas:

Genetic Analysis Algorithm for the Study of Patients with Multiple Congenital Anomalies and Isolated Congenital Heart Disease.

Delea, M.; Massara, L.S.; Espeche, L.D.; Bidondo, M.P.; Barbero, P.; Oliveri, J.; Brun, P.; Fabro, M.; Galain, M.; Fernández, C.S.; Taboas, M.; Bruque, C.D.; Kolomenski, J.E.; Izquierdo, A.; Berenstein, A.; Cosentino, V.; Martinoli, C.; Vilas, M.; Rittler, M.; Mendez, R.; Furforo, L.; Liascovich, R.; Groisman, B.; Rozental, S.; Dain, L.; on behalf of the PID ACM-CC Group. Genes 2022, 13, 1172. <https://doi.org/10.3390/genes13071172>

Análisis de anomalías cromosómicas, desbalances genómicos y variantes de secuencia como causa de cardiopatías congénitas.

Marisol Delea. Soledad Massara. Carlos David Bruque. Lucía Daniela Espeche. Melisa Ivana Taboas. Pablo Barbero. María Paz Bidondo. Rosa Liascovich. Boris Groisman. Viviana Cosentino. Celeste Martinoli, Lilian Furforo. Mónica Ritler. Emilio Kolomenski. Jaen Oliveri. Paloma Brun. Sandra Rozental. Liliana Beatriz Dain. Rev Argent Salud Pública. 2021;13:e31. <http://www.scielo.org.ar/pdf/rasp/v13/1853-810X-rasp-13-81.pdf>

Genetic Analysis Algorithm for the Study of Patients with Multiple Congenital Anomalies and Isolated Congenital Heart Disease.

Delea, M.; Massara, L.S.; Espeche, L.D.; Bidondo, M.P.; Barbero, P.; Oliveri, J.; Brun, P.L.; Fabro, M.; Galain, M.; Fernández, C.S.; Taboas, M.; Bruque, C.D.; Kolomenski, E.; Izquierdo, A.; Berenstein, A.J.; Cosentino, V.; Martinoli, M.C.; Vilas, M.; Rittler, M.; Mendez, R.; Furforo, L.; Liascovich, R.; Groisman, B.; Rozental, S.; Dain, L.B.; the PID ACM-CC Group. Proceedings 2021, 76, 8. <https://doi.org/10.3390/IECGE-07151>

An update on genetic variants of the NKX2-5.

Kolomenski JE, Delea M, Simonetti L, Fabbro MC, Espeche LD, Taboas M, Nadra AD, Bruque CD, Dain L. Hum Mutat. 2020 Jul;41(7):1187-1208. doi: 10.1002/humu.24030. Epub 2020 May 22. PMID: 32369864

A novel pathogenic frameshift variant of KAT6B identified by clinical exome sequencing in a newborn with the Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson syndrome.

Mendez R, Delea M, Dain L, Rittler M. Clin Dysmorphol. 2020 Jan;29(1):42-45. doi: 10.1097/MCD.0000000000000270. . PMID: 30921092

Double Autosomal/Gonosomal Mosaic Trisomy 47,XXX/47,XX,+14 in a Newborn with Multiple Congenital Anomalies.

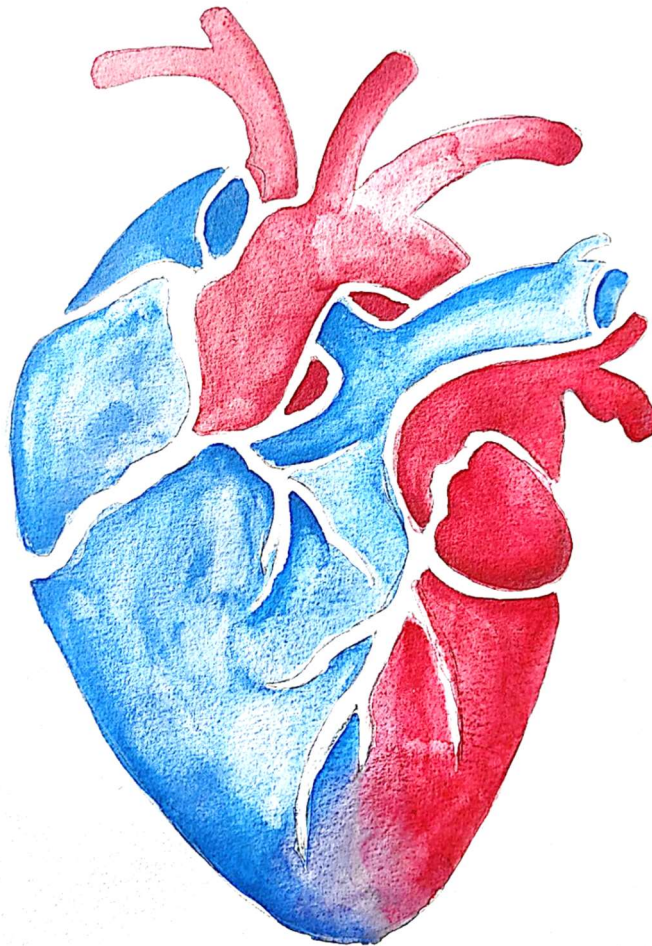
Massara LS, Delea M, Espeche L, Bruque CD, Oliveri J, Brun P, Furforo L, Dain L, Rozental S. Cytogenet Genome Res. 2019;159(3):137-142. doi: 10.1159/000504238. Epub 2019 Nov 30. PMID: 31786569

Genetic Imbalances in Argentinean Patients with Congenital Conotruncal Heart Defects.

Delea M, Espeche LD, Bruque CD, Bidondo MP, Massara LS, Oliveri J, Brun P, Cosentino VR, Martinoli C, Tolaba N, Picon C, Ponce Zaldúa ME, Ávila S, Gutnisky V, Perez M, Furforo L, Buzzalino ND, Liascovich R, Groisman B, Rittler M, Rozental S, Barbero P, Dain L. Genes (Basel). 2018 Sep 11;9(9):454. doi: 10.3390/genes9090454. PMID: 30208644

-CAPÍTULO I-

INTRODUCCIÓN



I.1 ANOMALÍAS CONGÉNITAS

Las anomalías congénitas (AC) también llamadas defectos congénitos, constituyen todas las condiciones potencialmente patológicas (morfológicas y/o funcionales) que se originan antes del nacimiento y pueden afectar la salud, el desarrollo y/o la supervivencia [1]. Las AC varían sustancialmente en gravedad, algunas se asocian con abortos espontáneos, muerte fetal o muerte en el período posnatal temprano. Las AC mayores se definen como cambios estructurales que tienen un impacto médico, social o cosmético que afecta al individuo y típicamente requieren una intervención médica [2]. Afectan al 3-5% de los recién nacidos [3] y representan la segunda causa de mortalidad infantil. Son estas condiciones las que explican la mayoría de las muertes, la morbilidad y la discapacidad relacionadas con AC (Figura 1) [2].

Las AC representan una proporción significativa de muertes neonatales en América Latina y la tendencia está creciendo. Sin embargo, tanto la tendencia como la contribución de este grupo de causas varían de un país a otro. Esto se debe, entre otros factores, a la precisión con la que se registran las causas de muerte, el acceso a técnicas de diagnóstico prenatal para cada grupo de población y la posibilidad de interrupción voluntaria del embarazo [4]. En los países cuya tasa de mortalidad es baja (menor a 6 defunciones por 1.000 nacidos vivos), las muertes por defectos congénitos representan entre 15 y 40% de las defunciones neonatales. En los que tienen una tasa de mortalidad neonatal alta (mayor a 12 por 1.000 nacidos vivos), las defunciones por defectos congénitos representan, en general, menos del 15% del total de defunciones de ese grupo etario. En el caso de los países con tasa de mortalidad intermedia (entre 6 y 12 por 1.000 nacidos vivos), el comportamiento es variable, con proporciones que oscilan aproximadamente entre 10 y 30% de la mortalidad neonatal [4]. De todas las muertes en la región debido a AC, el 28,4% (aproximadamente una de cada tres) se debe a las cardiopatías congénitas (CC) cuya tendencia se mantiene constante en el tiempo [4]

En contraste con las AC mayores, las AC menores, aunque son más prevalentes en la población general, son cambios estructurales que no constituyen un problema significativo para la salud en el período neonatal y tienden a tener limitadas consecuencias sociales o cosméticas en el individuo afectado. Entre este tipo de AC podemos mencionar al pliegue palmar único y clinodactilia. Las AC mayores a veces se encuentran asociadas con anomalías menores.

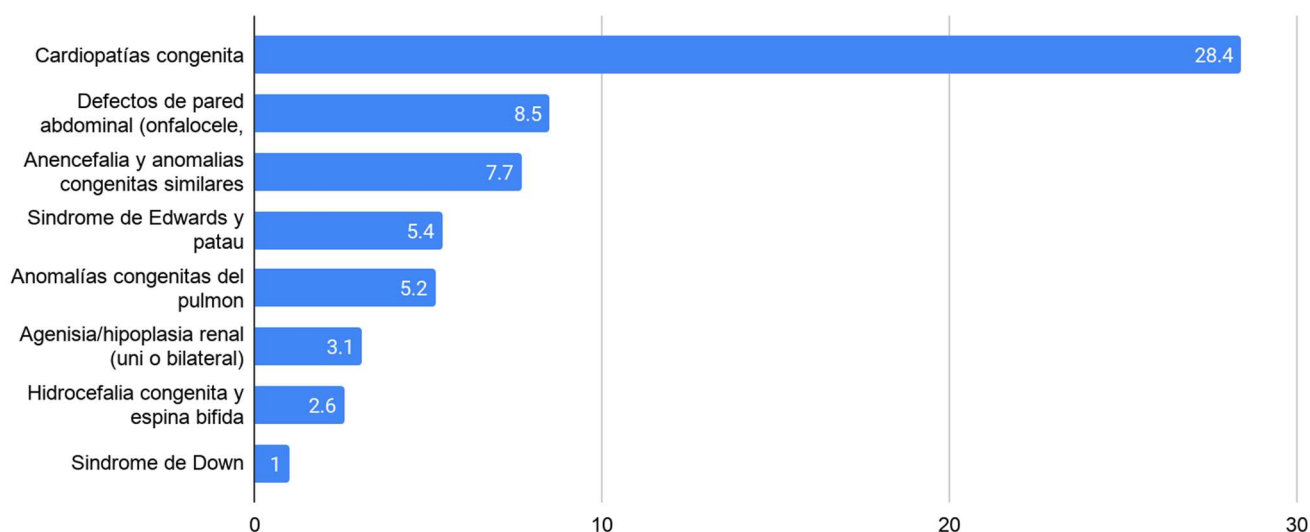


Figura 1: Anomalías congénitas y cromosómicas como causa de muertes neonatales en la región de las Américas, 2016. Adaptado de la Organización Panamericana de salud [4].

La etiología de las AC es heterogénea y abarca desde factores genéticos hasta teratogénicos. Sin embargo, en la actualidad, en aproximadamente el 50% de los afectados con AC se desconoce su causa. En Argentina, se estima una prevalencia del 1.82% (Red Nacional de Anomalías Congénitas de Argentina RENAC reporte 2022) [5] AC mayores detectadas al momento del nacimiento.

I.2 CORAZÓN NORMAL

El corazón es un órgano hueco compuesto por cuatro cámaras: dos aurículas y dos ventrículos (Figura 2). Tiene cuatro válvulas que regulan el flujo sanguíneo de una cámara a otra: las válvulas tricúspide y mitral que regulan la circulación entre las aurículas y los ventrículos; la pulmonar y la aórtica que regulan la circulación sanguínea fuera del corazón. Es un órgano muscular de consistencia firme y color rojo.

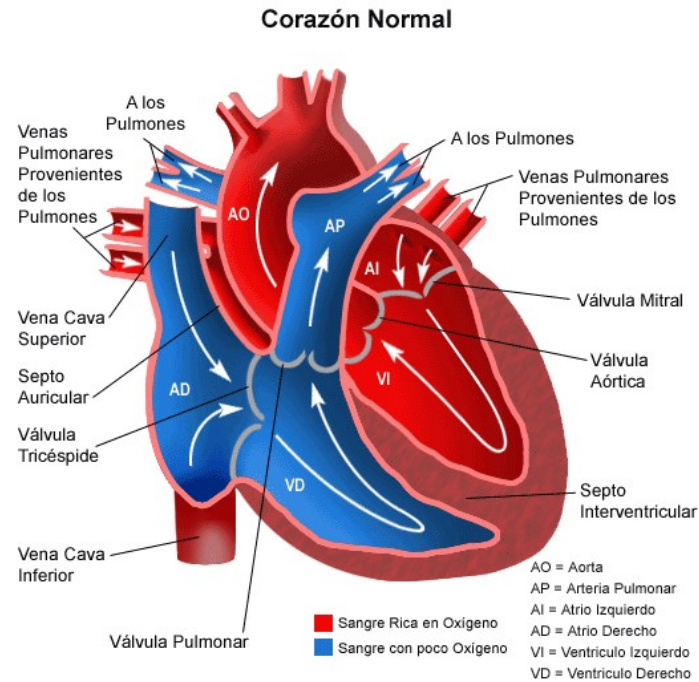


Figura 2: Esquema de las cavidades, válvulas, arterias y principales venas del corazón.

Adaptado de Stanford Medicine Children's Health [6].

1.2.1 Circulación postnatal

La sangre llega al corazón a través de las venas cavas y entra directamente en la aurícula derecha. La vena cava superior recolecta sangre de la cabeza y las extremidades superiores, y la vena cava inferior recolecta sangre del abdomen y las extremidades inferiores. La sangre coronaria que circula por el seno coronario también llega a la aurícula derecha. Desde la aurícula derecha, la sangre pasa a través de la válvula tricúspide al ventrículo derecho, y desde ahí, a través de la válvula pulmonar, hacia la arteria pulmonar. La sangre llega a los pulmones y luego entra de nuevo al corazón por las venas pulmonares que convergen en la aurícula izquierda. Este recorrido constituye la circulación menor.

De la aurícula izquierda la sangre se dirige a través de la válvula mitral hacia el ventrículo izquierdo. Una vez en el ventrículo izquierdo, la sangre es propulsada a la arteria aorta a través de la válvula aórtica dirigiéndose a todo el organismo. Posteriormente, la sangre vuelve al corazón a la aurícula derecha a través de las venas cavas, cerrando el círculo y constituyendo la circulación mayor (Figura 3).

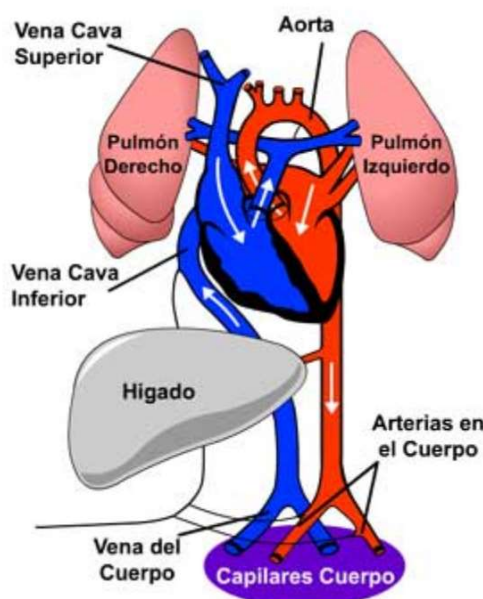


Figura 3: Esquema de la circulación post natal de la sangre. Adaptado de Burns P. [7]

1.2.2 Circulación fetal

En la fisiología cardíaca y el sistema cardiovascular, comprender las bases de la circulación fetal y los cambios que ocurren al nacer es muy importante para comprender muchas patologías que pueden ocurrir durante el período neonatal. La diferencia más importante es que el feto recibe oxígeno de la madre a través de la placenta, mientras que el niño, después del nacimiento, recibe oxígeno de los pulmones.

La sangre oxigenada viaja de la placenta al feto a través de la vena umbilical. El corazón fetal posee una abertura en el tabique interauricular llamado el foramen oval (FO), que permite que la mayoría de la sangre que llega a la aurícula derecha, en vez de pasar al ventrículo derecho, fluya principalmente hacia la aurícula izquierda. De la aurícula izquierda, la sangre oxigenada es bombeada al ventrículo izquierdo y luego a la aorta, que la transporta a los tejidos del cuerpo. La sangre regresa a la placenta a través de las arterias umbilicales (Figura 4).

La segunda diferencia característica de la circulación del corazón fetal respecto del corazón postnatal es el conducto arterioso (ductus) (CA), que conecta y permite el paso de sangre de la arteria pulmonar hacia la aorta, a la vez que la lleva a la placenta para su oxigenación. El ductus se cierra rápidamente después del nacimiento y la sangre en la arteria pulmonar va a los pulmones para oxigenarse.

En el feto, los pulmones no son funcionales y están llenos de líquido. La presencia de líquido hace que los pulmones sean resistentes al flujo de sangre que les llega, y sólo reciben suficiente sangre para sus necesidades de crecimiento y desarrollo.

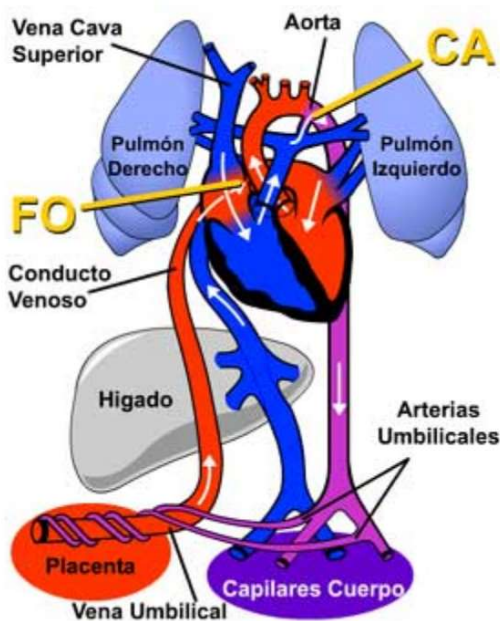


Figura 4: Esquema de la circulación normal de la sangre prenatal. CA: conducto arterioso. FO: foramen oval. Adaptado de Burns P. [7]

1.2.3. Desarrollo anatómico del corazón

El corazón es el primer órgano funcional en desarrollarse en el embrión [8]. Juega un papel vital en el bombeo de nutrientes y eliminación de los desechos tan pronto como el embrión alcanza un tamaño donde la difusión pasiva ya no es suficiente para asegurar la supervivencia celular.

El corazón maduro está compuesto principalmente por cuatro tipos de células: cardiomiocitos, endotelio, músculo liso y fibroblastos. Estos tipos de células se derivan de progenitores pluripotentes que se vuelven progresivamente restringidos en cuanto a su potencial de linaje, dando lugar a células progenitoras cardíacas multipotentes y, en última instancia, a los tipos de células diferenciadas del corazón [9].

Tras la fecundación, a partir de la división del cigoto, comienzan a diferenciarse los tipos de células que componen el cuerpo humano. Cada período prenatal posee características específicas. El período de blástula abarca desde el día 14 hasta la tercera semana de embarazo. En esta etapa, la nutrición se realiza por difusión. Aproximadamente a los 15 días de la fecundación tiene lugar la gastrulación, y el disco bilaminar que formaba el cigoto pasa a estar formado por tres hojas blastodérmicas. El epiblasto, formado por las células más

ventrales, formará el ectodermo. Desde esta capa se invaginarán células hacia el hipoblasto situado dorsalmente para dar lugar al endodermo. Las células que quedan entre estas nuevas capas formarán el mesodermo [10].

El corazón se forma a partir del mesodermo embrionario alrededor de 18 a 19 días después de la fecundación en humanos, fundamentalmente a partir de la lámina esplácnica del mesodermo lateral. Recibe una contribución importante de células de la cresta neural y una considerable inducción del endodermo en sus etapas iniciales [10].

El corazón de los vertebrados forma una estructura tridimensional compleja en las primeras etapas embrionarias con una amplia variedad de tipos celulares que derivan de progenitores cardíacos multipotentes, que son clones autorrenovables definidos por su presencia espacio-temporal y su potencial para diferenciarse en estos linajes específicos. Varios tipos de precursores mesodérmicos y los primeros progenitores cardíacos están presentes antes del compromiso con los campos cardiogénicos primario y secundario (CCP y CCS) [11].

El CCP se origina en el mesodermo esplácnico anterior (área cardiogénica, Figura 5) y da lugar a dos hebras simétricas llamadas tubos endocárdicos, compuestas principalmente por precursores del ventrículo izquierdo, las cuales se ahuecan para originar los dos tubos endocárdicos longitudinales emparejados, tapizados de endotelio. A partir del día 21 del desarrollo embrionario, conforme tiene lugar el plegamiento embrionario lateral, migran a la línea media, se aproximan entre sí y se fusionan, comenzando en el extremo cefálico y progresando en dirección caudal, para formar el tubo cardíaco primitivo. Para entonces este ya posee dos capas de tejido: una interna de tejido endotelial y una externa de células miocárdicas, separadas por una matriz extracelular llamada gelatina cardíaca [12–15]. El tubo cardíaco primitivo forma rápidamente cinco regiones distintas (de la cabeza a la cola): el tronco arterioso, el bulbus cordis, el ventrículo primitivo, la aurícula primitiva y el seno venoso (Figura 5).

El CCS deriva del mesodermo faríngeo situado en el centro de la medialuna cardíaca y se encuentra dorsal al tubo del corazón en formación. Esta población celular está excluida del tubo cardíaco primitivo; no se diferencian mientras se expanden por proliferación y, luego de iniciada la formación del asa cardíaca (o el *looping*), pueblan el corazón en crecimiento en sus polos de entrada y salida, que contribuyen a los vasos de entrada, aurículas, ventrículo derecho y tracto de salida [16].

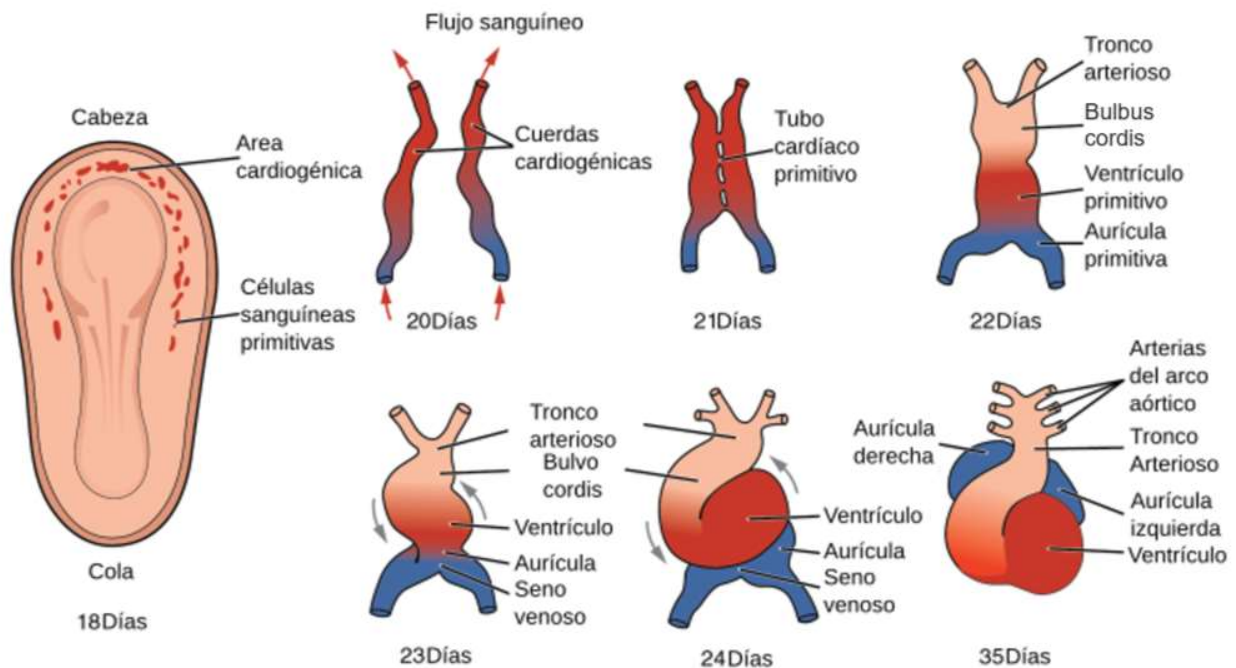


Figura 5: Esquema del desarrollo embriológico del corazón. Adaptado de *OpenStax* 19.5: Desarrollo del Corazón [17]

Inicialmente, toda la sangre venosa fluye hacia el seno venoso, y las contracciones impulsan la sangre desde la zona caudal hasta la cabeza, o desde el seno venoso hasta el tronco arterioso, patrón muy diferente al que ocurre en el adulto [8]. Esto genera circulación sanguínea, así como fuerzas hemodinámicas que también participan en el desarrollo de cámaras, válvulas y en un sistema de conducción más especializado [16].

Las cinco regiones del tubo cardíaco primitivo se convierten en estructuras reconocibles en un corazón completamente desarrollado. A medida que el tubo cardíaco primitivo se alarga como resultado del despliegue de las células del CCS, alrededor de la cuarta semana de gestación sufre una torsión y rotación hacia la derecha dentro del pericardio, lo cual posiciona a las aurículas por encima de los ventrículos. Asimismo, a partir del tracto de salida comienzan a emerger las arterias del arco aórtico [18].

Alrededor de la quinta y sexta semanas de desarrollo embrionario, se forman los tabiques cardíacos (septos) para dividir al corazón en cuatro cámaras. El bulbus cordis se desarrolla en el ventrículo derecho, el ventrículo primitivo forma el ventrículo izquierdo, el seno venoso desarrolla la porción posterior de la aurícula derecha y el nodo sinoauricular y la aurícula

primitiva se convierte en la porción anterior de las aurículas derecha e izquierda. En el tabique interauricular se forma un agujero de comunicación llamado foramen oval que no se cierra hasta después del nacimiento. El tronco arterioso (tracto de salida o conducto arterioso) se divide en la arteria pulmonar y la aorta, lo que resulta en la división de la circulación pulmonar y sistémica (menor y mayor), respectivamente. Más tarde ocurre una reestructuración valvular intensiva, formando las válvulas auriculoventriculares y semilunares entre la quinta y novena semana de gestación junto con el crecimiento de los ventrículos para completar la maduración del corazón. El establecimiento de esta simetría izquierda-derecha es muy importante para el desarrollo normal del corazón [19].

El músculo de la aurícula y los ventrículos primitivos son continuos. La aurícula actúa como marcapasos cardíaco transitorio, hasta que el seno venoso asume esa función. El nodo sinusal aparece durante la quinta semana de desarrollo, inicialmente en la pared del seno venoso, pero luego se incorpora a la pared de la aurícula derecha, cerca de la entrada de la vena cava superior. Junto con células de la región auriculoventricular (AV) forman el nodo y fascículo AV, localizado justo por encima de las almohadillas endocárdicas. Las fibras que nacen del fascículo AV pasan de la aurícula al ventrículo y se dividen en dos ramas, derecha e izquierda, que se distribuyen por todo el miocardio ventricular [18].

1.2.4 Factores paracrinos y endocrinos determinantes de la morfogénesis del corazón

En los últimos años con el advenimiento de nuevas estrategias para el estudio de la cardiogénesis, se produjo un cambio drástico en el modo de estudiar el desarrollo cardíaco. Este cambio implicó pasar de estudiar cortes secuenciales de corazones embrionarios de distintos animales, a la aplicación de los métodos moleculares de identificación de linajes celulares. Estas tecnologías brindaron una visión más dinámica del desarrollo del aparato cardiovascular y han permitido encontrar el origen, a veces insospechado, de varias estructuras anatómicas a partir de determinados grupos celulares, así como los genes y sus productos proteicos [20–24].

La morfogénesis del corazón es un proceso que requiere del posicionamiento oportuno, la migración, la proliferación y la especificación del destino celular de varias poblaciones celulares en concordancia con señales estructurales y mecánicas embrionarias [25]. Existen múltiples vías de señalización que desempeñan papeles críticos durante la cardiogénesis de manera secuencial y coordinada, incluyendo entre los principales actores a los morfógenos. Los

morfógenos son moléculas difusibles que especifican el tipo de célula que se genera en una localización anatómica específica. Como ejemplos podemos nombrar al ácido retinoico (RA, por su siglas en inglés de *Retinoic acid*), el factor beta transformante del crecimiento (TGF β , del inglés *Transforming Growth Factor β*), las proteínas morfogénicas óseas (BMP, del inglés *Bone Morphogenic Proteins*), las proteínas de vía de comunicación intercelular Hedgehog, la familia de proteínas Wnt y a los factores de crecimiento como el FGF (del inglés *Fibroblast Growth Factor*) [11,26,27]. Estas vías de señalización, en conjunto con factores de transcripción (FT), reguladores epigenéticos y ARNs no codificantes (ncRNAs, del inglés *non coding RNAs*) controlan la especificación de los progenitores cardíacos, la proliferación y diferenciación en diversos linajes de células cardíacas y contribuyen a construir el órgano [9,11].

A continuación, se describen brevemente algunas de las vías endócrinas y parácrinas protagonistas en la organogénesis del corazón a partir de los estudios realizados principalmente en modelos animales.

El RA es el metabolito bioactivo de la vitamina A. A nivel molecular se une a sus receptores intracelulares, los activa, y regula la expresión génica «rio abajo» mediante elementos de respuesta (RAREs). Los genes *Hox* son dianas cruciales de los receptores de este ácido en el proceso de morfogénesis [18]. Se demostró que el RA acelera la expresión de genes específicos del corazón, promueve el desarrollo de los cardiomiocitos ventriculares y su diferenciación, lo que indica que la señalización mediada por la RA tiene un papel importante en la proliferación y diferenciación de los cardiomiocitos embrionarios [28–31]. La señalización mediada por RA regula el patrón de los derivados del CCS a lo largo de los ejes anterior y posterior [11]. Particularmente, mediante elementos de respuesta de RARE se regula la expresión anteroposterior en el CCS de los genes *Hox*, determinando una subpoblación de células progenitoras cardíacas que más tarde dará lugar a miocardio auricular y subpulmonar [32,33]. La señalización de RA activa otro marcador de células progenitoras cardíacas, el FT Tbx5, que se expresa en el dominio posterior del CCS, así como en el CCP, y se requiere para activar genes específicos de las cámaras, como los factores natriuréticos auriculares A y B (*Nppa* y *Nppb* del inglés *natriuretic peptide precursor type A/B*). La señalización de RA especifica a las células que expresan Tbx5, progenitoras del CCP a un destino de células venosas y auriculares [32].

Los miembros de la superfamilia TGF- β contienen más de 30 factores de crecimiento polipeptídicos relacionados estructuralmente, incluidos TGF- β , BMPs, Activina y Nodal, que

desempeñan un importante papel en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la organogénesis. Esta vía se encuentra conservada en artrópodos y vertebrados [11]. TGF- β envía señales a través de sus receptores con actividad quinasa y mediadores río abajo, como por ejemplo Smads, que regulan una gran cantidad de procesos biológicos, entre ellos Smad4 que es central para la formación de mesodermo cardíaco [11].

Varios estudios en vertebrados demuestran que al menos tres miembros de la familia BMP, BMP-2, 4 y 7, se expresan durante la cardiogénesis. *BMP-2* se expresa en el endodermo lateral mientras que *BMP-4* y 7 se expresan en el ectodermo inmediato adyacente al mesodermo precardiaco [18]. Las BMPs son indispensables para la gastrulación y la formación del mesodermo primitivo en mamíferos. Asimismo, la activación de la vía de señalización BMP es importante para la diferenciación del CCP y la maduración del miocardio [11].

La Activina y el Nodal también son reguladores importantes de la gastrulación, la línea primitiva y la formación del mesodermo/endodermo, asimetría del eje izquierda-derecha del cuerpo y patrones posicionales en embriones tempranos y más tarde, para la cardiomiogénesis. Un estudio reciente en pez cebra reveló que el gen que codifica la subunidad A de Activina resulta crítico para la organización de la matriz extracelular localizada en el canal auriculoventricular, facilitando la migración de progenitores epicárdicos al tubo cardíaco en desarrollo [11].

La vía de señalización intercelular Wnt es una red de señales cuyas funciones también se han mantenido a través de la evolución de las especies. La familia Wnt comprende un grupo de genes de señalización que tiene una función muy importante en la organogénesis, tiene 19 proteínas diferentes y 10 tipos de receptores Frizzled [11]. Este grupo de genes determina la estructura interna de un órgano o la detención del crecimiento cuando el órgano alcanzó su tamaño apropiado. Otras funciones en las que se involucra a estos genes incluyen la polaridad celular, la reestructuración celular y el desarrollo axial [18].

Existen dos vías Wnt: la canónica (dependiente de β -catenina) y la no canónica (independiente de β -catenina) que involucran múltiples ligandos. La función de la vía Wnt canónica se ejerce a través del complejo transcripcional activo β -catenina/TCF (del inglés *T-cell factor*) en el núcleo. Antes de la gastrulación, las señales de Wnt canónicas están involucradas en las formaciones de líneas primitivas, mesodermo y endodermo, mientras que después de la gastrulación, una proteína relacionada con Frizzled (sFRP) y Dickkopf1 (Dkk1) secretada por el endodermo adyacente inhibe estas señales. Esta inhibición espacio-temporal de la señalización Wnt canónica es esencial para una mayor especificación cardíaca en el mesodermo. Las señales

activas de Wnt/ β -catenina promueven la formación de mesodermo y endodermo en la fase temprana de la diferenciación de células madres pluripotentes pero inhiben la miogénesis cardíaca después de que el mesodermo se haya establecido [11]. La señalización Wnt canónica regula específicamente la determinación del CCS, pero no el CCP, y también juega un papel importante en las etapas posteriores de la cardiogénesis embrionaria, que implica tanto la proliferación y el mantenimiento de los progenitores de CCS como la prevención de su diferenciación. Estudios recientes proponen a ALPK2 (*Alpha Protein Kinase 2*) como uno de los reguladores negativos de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina y promotor de la diferenciación y maduración [11].

La comprensión molecular de la señalización no canónica de Wnt todavía es rudimentaria y, por lo tanto, su cascada de señalización está menos establecida y no existe a la fecha, un gen indicador confiable de la señalización no canónica [34], si bien se postula que esta vía es necesaria para la especificación y diferenciación cardíaca. En estudios realizados con ratones *knock-out* para *Wnt5a* o *Wnt1*, se observaron alteraciones en el patrón de las arterias faríngeas y defectos en el tracto de salida. Por el contrario, la sobreexpresión *in vitro* de *Wnt11* promovió la determinación cardíaca y la diferenciación de los progenitores cardíacos derivados de células madre embrionarias murinas [11].

La vía de señalización Hedgehog (Hh) está integrada por más de 12 genes, y más que una vía unidireccional, estos genes conforman una red. En mamíferos se identificaron 3 miembros de esta familia de proteínas que participan en el proceso de morfogénesis cardíaca [18]: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh). En ratones se demostró que la vía de señalización Hh está involucrada en el establecimiento de la asimetría izquierda y derecha, la vasculatura coronaria, la septación auricular y la morfogénesis del tracto de salida [11].

Los factores de crecimiento actúan principalmente sobre la proliferación celular, aunque tienen también otras funciones celulares como la diferenciación, la supervivencia y la migración. La vía de señalización de FGF incluye más de 20 ligandos y 4 receptores tirosín-quinasa transmembrana y la mayoría de los miembros de esta familia desempeñan roles importantes como señales paracrinas y endócrinas en el desarrollo del corazón. Durante la diferenciación de células madre pluripotentes humanas, el FGF2 promueve específicamente la formación de precursores involucrados en la formación del mesodermo. Se describieron alteraciones del tracto de salida en un *knock-out* condicional del gen *Fgf8* en ratones, lo que sugiere que la

expresión mesodérmica de *Fgf8* es esencial para la formación de estructuras derivadas de CCS. De hecho, *Fgf8* regula la expresión de los genes *Isl1* y *Mef2c* que son marcadores de CCS. En el endocardio y en el epicardio murino se observa que *Fgf9* y genes relacionados como *Fgf16* y *Fgf20* se expresan en la mitad de la gestación y contribuyen a la proliferación y maduración miocárdica [11].

Muchos de los sistemas de transducción de señales usados por los factores de crecimiento para transferir información hacia el núcleo y modular la transcripción génica lo hacen a través de la actividad de los FT [18]. Tres factores de transcripción críticos para el desarrollo cardíaco que se han estudiado ampliamente son *Tbx5*, *Nkx2-5* y *Gata4*. Muchas de las estrategias para la transdiferenciación directa de fibroblastos en miocitos cardíacos dependen de estos factores, y es ahí donde radica la importancia de estos factores para las principales redes transcripcionales involucradas en la cardiomiogénesis [35]. Los estudios en *Drosophila* apuntan a un circuito regulador que incluye a miembros de la familia de estos FT en conjunto con la vía de Wnt y miembros de la familia de los Tgf- β [36].

Las proteínas de la familia de los genes *TBX* posee un alto grado de conservación filogenética, tienen un dominio de unión al ADN conservado -denominado T-box- y codifican FT que intervienen en la regulación del proceso de morfogénesis cardiovascular. Se observó que en presencia de una delección heterocigota del gen, la disminución de la expresión de *TBX1* influye de manera importante en la expresión génica inicial durante la morfogénesis cardíaca [37], particularmente en la elongación del tubo cardíaco en el polo anterior y en el mantenimiento de las células precursoras mesenquimatosas para la formación del tracto de salida y tabique.

NKX2-5 pertenece a un grupo de genes que codifican para FT con dominio *homeobox* (una secuencia de 180 pares de bases conservada en diferentes especies), los cuales poseen un papel importante en la regulación de la expresión genética tejido-específica esencial para la diferenciación tisular, así como en la determinación de patrones temporales y espaciales durante el desarrollo. Estos FT resultan críticos para la formación cardíaca en *Drosophila*, ya que su ausencia impide la formación del asa y la diferenciación de los ventrículos [27,37–39]. Asimismo, se demostró mediante ensayos de genes reporteros que *Nkx2-5* interactúa físicamente con *Tbx5* y activa sinérgicamente la transcripción de genes cardíacos [40,41], como por ejemplo el *Nppa*, gen clave e indicativo del desarrollo cardíaco [39,42].

La familia de los FT GATA consta de seis proteínas: GATA-1-6. GATA-1-2-3 son reguladores importantes de las células madre hematopoyéticas y sus derivados, mientras que los genes

GATA-4, 5 y 6 se expresan en varios tejidos derivados del mesodermo y endodermo. *GATA-4* muestra un patrón de expresión regulado en el desarrollo y específico de tejido en ratones: el ARNm de *GATA-4* se expresa en el corazón, intestino, gónadas, hígado, endodermo visceral y endodermo parietal durante el desarrollo embrionario y fetal. Este FT es uno de los primeros que se expresa en las células cardíacas murinas en desarrollo y su expresión se mantiene en los miocitos cardíacos a lo largo de la vida del animal. En contraste, *GATA-5* se detecta en el corazón, pulmones, cresta urogenital, vejiga y epitelio del intestino durante el desarrollo embrionario. *GATA-6*, por su parte, se expresa en el endodermo visceral, corazón, pulmones, cresta urogenital, células musculares lisas de los vasos sanguíneos, tracto gastrointestinal durante el desarrollo embrionario y fetal, mientras que en adultos se detecta en el miocardio, aorta, tracto gastrointestinal y en menor medida en el hígado y pulmones [43].

Se demostró que las células madre embrionarias deficientes en *GATA-4* tienen un potencial reducido de diferenciarse en cardiomiocitos *in vitro* y presentan deficiencias parciales en su capacidad para generar endodermo visceral y endodermo definitivo del intestino anterior. Además, los ratones transgénicos con inactivación del gen *GATA-4* mueren durante el desarrollo embrionario debido a que no se produce la morfogénesis ventral y la formación del tubo cardíaco. En los ratones deficientes en *GATA-4*, la diferenciación de los cardiomiocitos no se ve afectada y los genes río abajo como *Nppa* se expresan normalmente. El defecto de cardiogénesis en los ratones deficientes en *GATA-4* puede ser resultado de un defecto endodérmico temprano: la diferenciación anormal y la migración ventral de las células endodérmicas impiden el movimiento concomitante de las células miocárdicas, lo que lleva a un cardias bífido [43].

Los ratones deficientes en *GATA-6* mueren poco después de la implantación debido a un funcionamiento anormal del endodermo visceral y defectos en los tejidos extraembrionarios. Además, la falta de *GATA-6* parece evitar la generación del epitelio bronquial derivado del endodermo. En cuerpos embrionarios derivados de células madre embrionarias deficientes en *GATA-6*, la diferenciación anormal se acompaña de niveles atenuados de ARNm de *GATA-4*, lo que sugiere que *GATA-6* puede regular la expresión de *GATA-4* durante la diferenciación [43].

En conjunto, la expresión de *GATA-4* parece ser indispensable para una diferenciación endodérmica adecuada y la morfogénesis ventral, pero no necesariamente para la

diferenciación de los cardiomiocitos, donde *GATA-6* puede ser capaz de reemplazar a *GATA-4* [43].

Otros FT que se conoce estarían involucrados en el desarrollo cardíacos son *HAND1* y *HAND2*. En estudios realizados en embriones de ratón y de pollo se demostró su presencia en los tubos endocárdicos primitivos. En etapas más avanzadas de la morfogénesis cardíaca regulan la determinación del destino y la diferenciación celular en muchos tejidos diferentes durante el desarrollo embrionario [18].

Además de los estudios realizados en modelos animales, otros estudios realizados en pacientes con CC en los que se buscaban variantes en el número de copia (CNVs, por sus siglas en inglés de *copy number variants*), permitieron identificar genes candidatos que regularían genes críticos del desarrollo cardiovascular [39]. Se identificaron siete genes candidatos *PRKCB*, *HIRA*, *SOX2*, *ING2*, *TP63*, *BCL6* y *PAX3* que intervienen en la vía de unión a la cromatina, y entre los FT con efecto confirmado en la cardiogénesis se incluyen *LBX1* (*SKOR1*), *TBX1*, *EN1*, *SOX2* y *PAX3*.

Finalmente, los ncRNAs tienen una enorme influencia en una amplia gama de funciones celulares, incluida la expresión génica. En particular, es bastante conocido el rol fundamental que cumplen los micro RNAs (miRNAs, poseen 20-25 nucleótidos de longitud) en la biología cardíaca [44]. Otro tipo de ncRNAs, los largos (lncRNAs, poseen más de 200 nucleótidos de longitud) también participan en el desarrollo cardíaco y la homeostasis celular [45]. Estos tipos de ncRNAs son reguladores importantes de la biología cardíaca, incluida la identidad y la diferenciación del linaje. En algunos casos, regularían la arquitectura nuclear y pueden mediar interacciones y bucles de cromatina. Como ejemplo podemos nombrar a *Braveheart*, que se expresa desde principios de la embriogénesis. La pérdida de *Braveheart* durante la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón da como resultado una reducción dramática en la miogénesis. Estudios de transcriptómica realizados sugieren que *Braveheart* está río arriba de *Mesp1* y controla la expresión de reguladores críticos de cardiomiogénesis, incluyendo *Hand1*, *Hand2*, *Nkx2-5* y *Tbx20* [46].

Fendrr es otro lncRNA que regula la cardiogénesis [47,48]. La delección homocigota de *Fendrr* produce letalidad embrionaria en ratones en los que se observa defectos de la pared corporal, disfunción e hipoplasia miocárdicas. Este lncRNA se expresa en un subgrupo de células progenitoras cardíacas, y en su ausencia, se observó que se expresan niveles inusualmente altos de *Gata6* y *Nkx2-5*, FT críticos para la morfogénesis de la pared corporal y el desarrollo

cardíaco. Fendrr se une a los complejos PRC2 y TrxG sugiriendo que actúa como modulador de las modificaciones de histonas en los *loci* relevantes para la morfogénesis de la pared corporal y cardiogénesis [47].

. La organización regulada de la cromatina en tres dimensiones dentro del núcleo, así como las interacciones de la cromatina con la periferia nuclear juegan un papel importante en la regulación de la función celular y la estabilidad del linaje. Los ncRNA y las interacciones complejas entre el ARN y los FT reguladores de la expresión génica demandan enfoques genómicos de la biología de sistemas para comprender las contribuciones relativas a los fenotipos celulares [9].

I.3 CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

I.3.1 Generalidades y epidemiología

Las CC son causadas por el desarrollo anómalo del corazón durante el periodo embrio-fetal. Abarcan un amplio espectro de anomalías que afectan la estructura de las cavidades cardíacas y/o de los grandes vasos que van desde defectos sin significancia clínica relevante hasta defectos complejos que amenazan la vida. La mayoría son toleradas durante la vida intrauterina y se manifiestan después del nacimiento, cuando se pierde el contacto con la circulación materna [49].

Las CC son las anomalías congénitas más comunes, seguidas de las anomalías de las extremidades, las anomalías congénitas del riñón y el tracto urinario y las anomalías del sistema nervioso. Según Pierpont y colaboradores, las CC afectan a aproximadamente 10 a 12 de cada 1000 recién nacidos vivos (1%-1.2%) [50]. Como no todos los individuos con CC son diagnosticados tempranamente, su prevalencia real es difícil de estimar. Un trabajo en Canadá estima una prevalencia general es de 13.1 por cada 1000 niños y 6.1 por cada 1000 adultos [51]. También describen que la prevalencia de las CC aumentó un 11% en niños y un 57% en adultos de 2000 a 2010 [51]. Por su parte, un meta-análisis reciente da cuenta de una prevalencia global de CC de 9.41 por cada 1000 nacimientos vivos, y también muestra un aumento sustancial en las últimas décadas [52,53]. El tipo más común es la comunicación intraventricular (CIV), que representa aproximadamente el 35% de las CC, seguido de la comunicación intraauricular (CIA) y el ductus arterioso persistente (DAP). La prevalencia de estas lesiones "leves" (defectos que generalmente tienen un impacto hemodinámico y clínico menos significativo) ha aumentado en las últimas décadas según los autores, debido

probablemente a ciertos avances que permiten una detección más precisa, mientras que las lesiones "graves" muestran una tendencia relativamente constante en su prevalencia [52,53].

Históricamente, la supervivencia de la mayoría de los pacientes recién nacidos y de los lactantes con CC era baja debido a las escasas opciones de tratamiento. Sin embargo, esta situación se modificó con la primera derivación sistémica de la arteria pulmonar realizada por Taussig y colegas en 1945 [54]. Desde entonces y gracias a los avances en cirugía y cardiología intervencionista, hoy en día más del 85% de estos pacientes llegan a la edad adulta con vida [55]. Si bien se observan fallecimientos entre los lactantes que presentan CC -en especial para los recién nacidos con bajo peso incluso aún después de la intervención quirúrgica [56]- actualmente la mayoría de los pacientes sobreviven hasta la edad reproductiva [57]. Se estima que hay aproximadamente 50 millones de pacientes adultos con CC en todo el mundo y se espera que su prevalencia aumente en forma sostenida hasta 2050, lo que implica la necesidad de un asesoramiento preciso sobre el riesgo de recurrencia [55].

Si bien las presentaciones clínicas y la gravedad de las enfermedades del corazón dependen de sus tipos o subtipos, la mayoría de los niños con CC presentan retraso del crecimiento, tos, infecciones del pecho a repetición, dificultad para respirar, intolerancia al ejercicio y coloración azulada de las membranas mucosas (cianosis) [58]. Las CC pueden ocurrir como un defecto de nacimiento aislado o en conjunto con anomalías extracardíacas, incluyendo rasgos craneofaciales anormales, otras AC, anomalías en el desarrollo y/o retraso en el crecimiento. De hecho, se estima que la frecuencia general de anomalías extracardíacas, incluyendo retraso neurocognitivo, oscila entre el 20% y el 44% en los individuos con CC [56,59].

A partir de datos recopilados de un sistema de vigilancia poblacional, Miller y colaboradores reportaron que entre los niños y recién nacidos con CC, el 71.3% presentaba una cardiopatía aislada, el 13.5% presentaba un patrón no definido de anomalías congénitas múltiples (ACM), el 13.1% tenía síndromes específicos y el 2.0% presentaba defectos de lateralidad. La proporción de ACM se encontraba dentro del rango descrito en otros estudios epidemiológicos, en donde se reportaban que oscilaban del 5.9% al 14.1% [60]. A su vez, diversos estudios estiman que el riesgo general de recurrencia es del 3 al 9% [61–64], con una variación según la malformación en cuestión, lo que indicaría que algunas malformaciones poseen un mayor componente hereditario que otras [62,65–69].

1.3.2 Clasificaciones de las cardiopatías congénitas

Existen diversas clasificaciones de las CC que tienen en cuenta distintos factores y utilizan distintos criterios de clasificación [70]. Es posible realizar una clasificación en base a la clínica, según los mecanismos de patogénesis o en forma genérica

1.3.2.1 Clasificación clínica

Desde el punto de vista clínico, una de las clasificaciones más usadas es aquella que considera si la CC es acianóticas o cianóticas [71]. Son llamadas así debido a la coloración azulada de la membrana mucosa que caracteriza clínicamente a los defectos cardíacos cianóticos provocados por un aumento del nivel de hemoglobina desoxigenada que se corresponde con un suministro deficiente de oxígeno a los tejidos corporales. Las CC cianóticas se consideran las formas más graves de las CC [72]. Este tipo de clasificación propuesta por la *Society of Thoracic Surgeons National Congenital Heart Surgery Database Committee*, 2000 (Shanley y col., 2007), se muestra en la Tabla 1.

1.3.2.2 Clasificación según mecanismos de patogénesis

Se pueden clasificar a las CC de acuerdo a las alteraciones que ocurren en algunos de los siguientes mecanismos que intervienen en el desarrollo del corazón:

- Migración de tejido mesenquimal
- Hemodinamia cardíaca
- Muerte celular
- Matriz extracelular

Estas alteraciones, ya sea en forma independiente o en conjunto poseen un rol preponderante en la causa de las malformaciones cardíacas [73].

Tabla 1. Clasificación de las cardiopatías congénitas según la *Society of Thoracic Surgeons National, Congenital Heart Surgery Database Committee, 2000*

Cardiopatías congénitas acianóticas	Con desviaciones del flujo sanguíneo de izquierda a derecha	Comunicación interauricular (CIA)	
		Comunicación interventricular (CIV)	
		Defecto del canal auriculoventricular completo (CAVC)	
		Ventana aortopulmonar (Ventana AP)	
		Ductus arterioso persistente (DAP)	
	Con lesiones obstructivas del lado izquierdo	Coartación de la aorta (CoA)	
		Estenosis aórtica congénita	
		Interrupción del arco aórtico (IAA)	
		Estenosis mitral	
Cardiopatías congénitas cianóticas	Lesiones asociadas con disminución de la circulación pulmonar (desviación de derecha a izquierda)	Tetralogía de Fallot (TDF)	
		Estenosis de la válvula pulmonar (EP)	
		Atresia pulmonar (AP)	Con septo ventricular intacto (AP/SVI)
			Con comunicación interventricular (AP/CIV)
		Atresia tricuspídea	
		Anomalía de Ebstein (AE)	
	Lesiones asociadas con incremento de circulación pulmonar (mezcla de sangre completa)	Transposición de grandes vasos (TGV)	Con septo ventricular intacto
			Con comunicación interventricular (TGV/CIV)
		Doble salida del ventrículo derecho (DSVD)	
		Conexión venosa pulmonar anómala	
		Trunco arterioso persistente (TAP)	
	Fisiología de un ventrículo	Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (SCIH)	
		Doble entrada del ventrículo izquierdo (DEVI)	

1.3.2.2.1 Migración de tejido mesenquimal

Durante el desarrollo embrionario temprano del corazón, el material celular disponible no es suficiente para completar la morfogénesis [74], por lo que se requiere la contribución de grupos de células adicionales para lograr una formación completa del órgano. Estos grupos de células provienen del tejido mesenquimal de los arcos branquiales y están involucrados en el desarrollo del corazón. Específicamente, se demostró que las células del 4to y 6to arco branquial izquierdo contribuyen de manera asimétrica a la región posterior septal del tracto de salida en desarrollo del corazón. En cambio, las células del 4to y 6to arco branquial derecho contribuyen al septo que separa el lumen de las arterias aorta y pulmonar [75]. También, se demostró que la mayor parte del tejido de la región conotroncal del corazón se forma a partir de la migración de tejido mesenquimal hacia esta área. Particularmente, durante las etapas tempranas de la formación del asa cardiaca, las células que forman parte del saco aórtico al finalizar la morfogénesis cardiaca forman una porción del ventrículo derecho [76].

La disminución de la velocidad de migración y la muerte celular pueden resultar en un espectro de morfologías cardiacas anormales, entre ellas la doble salida de ventrículo derecho [77]. A su vez Kirby y colaboradores, describieron que la remoción de una porción occipital de la cresta neural en embriones de pollo puede dar lugar a malformaciones similares al tronco arterioso, a la doble salida de ventrículo derecho y también a hipoplasia de timo [78].

Algunas de las CC causadas por alteraciones en la migración son las anomalías del tracto de salida del corazón que son anatómicamente clasificadas como **malformaciones conotroncales**. La patogénesis de estas malformaciones está relacionada a anomalías en el tejido mesenquimal y/o a la migración de células de la cresta neural. Estas malformaciones pueden ocurrir aisladas o en asociación a otras anomalías cardiacas. El espectro de malformaciones conotroncales humanas varía desde la separación de los anillos valvulares aórtico y mitral, hasta la ausencia completa de tabicación del polo de salida del corazón (Tabla 2).

Las células de la cresta neural migran en etapas. Mientras que la disrupción de uno de los grupos de células de la cresta neural podría afectar sólo el desarrollo cardíaco, la disrupción de grupos de células adyacentes podría resultar en anomalías cardiacas y faciales [79].

Tabla 2: Anomalías conotroncales

Tipo de anomalía conotroncal
Comunicación interventricular subaórtica (tipo 1) (sCIV)
Ventana aortopulmonar (VAP)
Doble salida del ventrículo derecho (DSVD)
Tetralogía de Fallot (TDF)
Transposición de grandes vasos (tipo D) (TGV)
Tronco arterioso (TA)
Interrupción del arco aórtico -tipo B
Atresia pulmonar con comunicación interventricular (AP-CIV)

La evidencia en humanos que conecta las malformaciones conotroncales con anomalías de migración del tejido de la cresta neural o arcos branquiales anormales surge del análisis de síndromes de arcos branquiales como por ejemplo el síndrome de Goldenhar o displasia-óculo-aurículo-vertebral (OMIM: 164210). Este síndrome presenta un amplio espectro de anomalías congénitas que abarca las estructuras derivadas de los dos primeros arcos branquiales, que se encuentra frecuentemente asociado con asimetría facial y anomalías cardíacas, con una mayor prevalencia de cardiopatías congénitas conotroncales (CCC) [80,81]. Otro ejemplo es el síndrome de DiGeorge (SDG, OMIM: 188400) que incluye anomalías de los tejidos derivados del tercer y cuarto arco branquial como el timo y las glándulas paratiroides, y que presentan además anomalías faciales y cardíacas. Entre las anomalías cardíacas, alrededor del 80-95 % son del tipo conotroncales [82,83]. El síndrome de CHARGE (OMIM: 214800) presenta atresia de coanas, coloboma, anomalías cardíacas, retraso mental e hipoplasia genital. Las CCC más frecuentes en pacientes con los síndromes mencionados presentan son la Tetralogía de Fallot (TDF), la interrupción del arco aórtico (IAA) y la atresia pulmonar con CIV (AP-CIV) [84,85].

De destacar es que algunos síndromes inducidos por teratógenos como la isotretinoína y la talidomida, también presentan anomalías conotroncales entre ellas TDF, trasposición de grandes vasos (TGV) y doble salida de ventrículo derecho (DSVD) [86,87]. Los mecanismos subyacentes de las acciones teratogénicas de la talidomida siguen siendo controvertidos. Se sugirió que la droga afecta múltiples tejidos al involucrar un proceso global como la angiogénesis, posiblemente a través de su impacto en el citoesqueleto de actina de las células endoteliales en rápida proliferación y al prevenir su migración [88]. Es posible, por lo tanto, que

la talidomida tenga un papel en la migración celular provocando anomalías cardíacas además de las que se observan en las extremidades [79].

1.3.2.2 Hemodinamia cardíaca

El sistema cardiovascular provee sustento al embrión mientras atraviesa diversos cambios morfológicos [89,90]. De acuerdo con la hipótesis del “modelado del flujo sanguíneo”, en la que el flujo sanguíneo tiene un efecto morfogénico, los tabiques cardíacos se forman en el punto de menor flujo y resistencia entre las corrientes. Estas fuerzas hemodinámicas serían las responsables de la formación de las cámaras cardíacas y de las válvulas [79,91,92]. El flujo sanguíneo y la sobrecarga hemodinámica determinan la selección del arco aórtico, el volumen de la cámara y el tamaño del orificio de la válvula.

1.3.2.2.a Mecanismos de alteración de la hemodinamia

Después de la tabicación ventricular, el corazón funciona como un circuito en paralelo. Pequeños cambios en la resistencia en una parte del circuito desvían la sangre de esa rama hacia la otra. Dos puntos de resistencia variables, el conducto venoso y el canal auricular (CA), están presentes en las etapas tardías del desarrollo embrionario y fetal. Cada conducto responde a prostaglandinas e inhibidores de prostaglandinas. Dado que la resistencia vascular es proporcional al radio, pequeños cambios en el calibre del CA tendrían un gran efecto sobre la porción del flujo sanguíneo. Una disminución transitoria del radio del CA aumentaría la resistencia y disminuiría el flujo sanguíneo del corazón derecho. La obstrucción del conducto a largo plazo puede producir AP con tabique ventricular intacto o estenosis pulmonar (EP). Los eventos extracardíacos e intracardíacos también pueden alterar el equilibrio del flujo sanguíneo intracardíaco y las infecciones intrauterinas pueden alterar las paredes vasculares cambiando la proporción del flujo sanguíneo. Algunas malformaciones cardíacas congénitas pueden ser consecuencia de cambios en un lecho vascular que está alejado del corazón y del que no quedan indicios luego del nacimiento [93]. Asimismo, se ha sugerido que la asociación entre CC y las membranas del cuello en el síndrome de Turner puede estar relacionada con la compresión aórtica extrínseca de los vasos linfáticos dilatados [94].

1.3.2.2.b Cardiopatías causadas por alteraciones en la hemodinamia.

En la Tabla 3 se lista un grupo de anomalías congénitas del corazón que estarían relacionadas a patrones de flujo anormal de sangre

Tabla 3: Malformaciones relacionadas a hemodinámicas cardiacas alteradas

Malformaciones asociadas a alteraciones de la hemodinamia
Coartación de aorta sin comunicación interventricular (COA)
Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (SCIH)
Estenosis de la válvula aórtica (EA)
Interrupción del arco aórtico -tipo A (IAA-A)
Comunicación interauricular (CIA)
Atresia pulmonar sin comunicación interventricular (AP)
Comunicación interventricular perimembranosa (tipo II) (CIV-ii)

La alteración de la distribución del flujo sanguíneo intracardíaco puede ser responsable de la hipoplasia del corazón izquierdo y derecho. En el útero, la mayor parte del flujo sanguíneo hacia el corazón izquierdo atraviesa el tabique auricular a través del forámen oval (FO). Por lo tanto, la relación FO/tabique auricular se utiliza como índice del flujo sanguíneo transatrial. Esta relación es más pequeña de lo normal en corazones con coartación de aorta (CoA) o estenosis aórtica (EA) y más grande de lo normal en corazones con EP, AP o CIA [95]. Estas observaciones sugieren que el volumen de flujo sanguíneo transauricular se correlaciona directamente con el sitio y la gravedad de la lesión cardíaca. La CIA sería una consecuencia del aumento del flujo sanguíneo transatrial que agranda el FO y erosiona la válvula. La reducción severa del flujo sanguíneo del corazón izquierdo conduciría a un corazón izquierdo hipoplásico. Una disminución transitoria del flujo sanguíneo a través de la válvula aórtica puede resultar en una apertura parcial de las valvas aórticas y una fusión subsecuente produciendo una válvula aórtica bicúspide.

Otro ejemplo es la CIV perimembranosa que puede ser consecuencia de un desequilibrio del flujo sanguíneo intracardíaco que afecta al corazón antes de completar la tabicación ventricular. Durante la separación de las cámaras ventriculares, un aumento del flujo sanguíneo del corazón izquierdo puede deformar las relaciones espaciales normales de los tabiques muscular y conotruncal, lo que da como resultado un defecto del tabique ventricular membranoso [79].

1.3.2.2.3 Muerte Celular

El desarrollo del corazón implica una compleja interacción entre la división celular, la migración celular, la elaboración de matriz extracelular y la muerte celular. En este proceso, la muerte

celular es responsable de moldear y remover el tejido cardíaco, lo que es particularmente importante en la formación de las válvulas cardíacas y el tabique trabecular.

Investigaciones realizadas por Pexieder [96] demostraron que el patrón de muerte celular se ve alterado por fármacos teratogénicos y alteraciones en el flujo sanguíneo intracardíaco. De hecho, la fuerza hemodinámica puede tener un papel clave en el moldeado del miocardio, lo que sugiere una conexión entre la fuerza hemodinámica y el moldeado del corazón [79].

Algunas CC pueden estar relacionadas con anomalías en la muerte celular. Por ejemplo, se ha sugerido que los defectos del tabique ventricular muscular se deben a una muerte celular excesiva que conduce a la perforación del tabique. Además, la malformación de Ebstein, que es una falla en la separación de la válvula tricúspide de la pared ventricular, también estaría relacionada con anomalías en la muerte celular [79].

1.3.2.2.4 Defectos de la matriz extracelular

En las estructuras individuales del corazón se producen cambios espaciales y temporales importantes en la composición de la matriz extracelular (ME) a medida que éstas se desarrollan, remodelan y maduran. En los tejidos cardíacos en desarrollo se encuentran representantes todas las clases de macromoléculas de la ME, entre ellas, el hialuronano o ácido hialurónico (AH), proteoglicanos, colágenos, elastina, fibrilina, tenascina, fibronectinas y lamininas. Si bien los roles específicos de muchas de estas moléculas aún no se han dilucidado completamente, la importancia de otras se ha revelado mediante la vinculación genética con enfermedades congénitas en humanos y/o mediante estudios en modelos animales [97].

Los glicosaminoglicanos (GAG) son cadenas de polisacáridos que consisten en unidades de disacáridos de aminoazúcar y ácido urónico repetitivas. Hay cuatro clases de GAG, el más abundante en el corazón en desarrollo es el AH. Las enzimas UDP-N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa y UDP-glucosa deshidrogenasa son necesarias para la síntesis de los bloques de construcción del AH. Una variante de secuencia en la UDP-glucosa deshidrogenasa en pez cebra produce la malformación de las almohadillas aurículo ventriculares (AV) y alteración en el patrón de expresión génica en el miocardio AV [97].

Las otras tres clases de GAG son sulfato de condroitina/sulfato de dermatán (CS/DS), heparán sulfato (HS) y sulfato de queratina. Estos GAG se encuentran en la ME del corazón unidos a proteínas nucleares de proteoglicanos. A diferencia de los otros GAG, el AH se sintetiza en la

membrana plasmática y no se une a una proteína nuclear. El AH forma parte de una matriz pericelular que proporciona un entorno hidratado que facilita la proliferación y movilidad celular. En el corazón en desarrollo, el AH se encuentra en la gelatina cardíaca, y a medida que avanza el desarrollo, en los tejidos derivados de las almohadillas AV, tractos de salida y en las válvulas en formación. El AH también está presente en el mesénquima epicárdico y en el espacio intersticial que rodea a los cardiomiocitos de las estructuras miocárdicas en el corazón [97].

El AH es importante para el desarrollo del corazón de mamíferos. El tratamiento de embriones de rata cultivados con hialuronidasa resulta en la pérdida de la gelatina cardíaca, formación anormal de las almohadillas endocárdicas, adelgazamiento de la pared del miocardio ventricular y alteración del rendimiento ventricular [97]. Resultados similares se hallaron utilizando ratones *knock-out* del hialuronano-sintasa 2 (*Has2*). El ARNm de *Has2* se expresa normalmente en las células miocárdicas y endocárdicas, pero a medida que se desarrolla la unión AV, la expresión se restringe virtualmente al endocardio y el mesénquima de las almohadillas endocárdicas del canal AV y tractos de salida. Los ratones *knock-out* de *Has2* son incapaces de producir AH lo que conduce a una letalidad embrionaria. Los embriones nulos de *Has2* se caracterizan por malformaciones cardíacas graves que incluyen miocardio delgado y desarrollo deficiente de las almohadillas AV [97].

A pesar de que los estudios en el corazón aviar y murino muestran claramente la importancia del AH en el desarrollo cardíaco, hasta el presente, no hay estudios publicados que demuestren que su insuficiencia está asociada con enfermedades cardíacas congénitas en humanos.

1.3.2.3 Clasificación genérica

En el 2002 el “International Congenital Heart Surgery Nomenclature” propuso un sistema de clasificación genérico [98]. De acuerdo con esta clasificación, las CC se dividen en hipoplásicas, defectos de obstrucción, defectos septales y defectos cianóticos.

En la hipoplasia, el desarrollo de un lado del corazón es defectuoso, lo que hace que solo el otro lado sea capaz de bombear sangre. Dependiendo del lado afectado, se puede llamar síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (SCIH) o síndrome del corazón derecho hipoplásico (SCDH). Además de otros síntomas, la cianosis también ocurre en la hipoplasia. Esta condición es rara, si bien, es el tipo más grave de CC.

Cuando las válvulas, venas o arterias del corazón son muy estrechas o están bloqueadas, se producen CC debido a estos defectos de obstrucción como, por ejemplo, EA, CoA y EP, junto con algunos tipos raros, como la estenosis subaórtica y la estenosis de la válvula aórtica bicúspide. Los síntomas de los defectos de obstrucción son principalmente hipertensión o agrandamiento del corazón [70].

En los defectos del tabique, existe un problema en la formación del tabique entre las aurículas y los ventrículos, son las CC más frecuentes, en particular las CIV seguidas de las CIA.

Finalmente, los defectos cianóticos son defectos que presentan conexión venosa anómala, como TAP, TDF y TGV [70].

También podemos clasificarlas a las CC en complejas o simples según si se encuentran en conjunto con otro defecto cardíaco o no [70], según si se presentan o no asociadas a defectos congénitos extracardíacos (aisladas o asociadas), según criterios genéticos (sindrómicas y no sindrómicas), según pronóstico (críticas, potencialmente críticas y no críticas) [18]. Por su parte, Hoffman y Kaplan proponen una clasificación basada en la gravedad del defecto congénito [99].

Las CC también pueden agruparse en función de la naturaleza estructural del defecto cardíaco [100,101], los patrones de flujo sanguíneo resultantes [102], los riesgos de recurrencia familiar observados [63,103,104] y los genes de susceptibilidad compartidos [103]. A menudo se clasifican en categorías como lesiones del lado derecho, lesiones del lado izquierdo, defectos conotruncales, defectos de lateralidad y defectos septales aislados. Las lesiones del lado derecho incluyen SCDH, anomalía de Ebstein y AP. Las lesiones del lado izquierdo incluyen válvula aórtica bicúspide, EA, CoA y SCIH. Los defectos de lateralidad incluyen heterotaxia (HTX), defecto del canal auriculoventricular completo (CAVC), anomalía total del retorno venoso pulmonar (ATRP), TGV, dextrocardia y *situs inversus*. Los defectos del tabique aislados incluyen a la CIA y CIV [100].

I.4 ETIOLOGÍA DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

Como ya se mencionara, las alteraciones en el desarrollo del corazón dan como resultado una variedad de CC. A pesar de los avances en técnicas moleculares, las causas moleculares y los mecanismos subyacentes de las CC siguen siendo objeto de debate [24,52,56].

Existe consenso en que las CC son el resultado de factores genéticos y ambientales, aunque algunos autores consideran que la contribución genética sería predominante [52,70].

Los principales factores ambientales claramente identificados (factores de riesgo no genéticos) representan a aproximadamente el 10% de las CC. Los más estudiados incluyen las condiciones de salud materna como la obesidad y la diabetes mellitus, el consumo de alcohol por parte de la madre, el tabaquismo materno, la exposición materna a ciertos medicamentos durante el embarazo (antidepresivos, anticonvulsivantes y antiarrítmicos), la fiebre materna durante el primer trimestre (que posiblemente se correlaciona con el efecto teratogénico de diferentes microorganismos), el tabaquismo paterno y la edad avanzada del padre [52].

Las contribuciones genéticas representarían el 90% restante, y si bien más de la mitad de las CC no tienen una etiología identificada, es probable que en un futuro cercano las mismas puedan explicarse mediante interacciones gen-gen, interacciones gen-ambiente y herencia poligénica, motivo por el cual, la etiología de las CC aún se investiga intensamente [52].

La mayoría de los casos de CC son esporádicas y de ellas, una gran proporción se explica por eventos genéticos *de novo* y sin bien se distinguen también casos de herencia mendeliana, éstos representan una proporción menor de todas las CC [70,105]. Se describió una alta incidencia de CC en algunas poblaciones con una alta tasa de consanguinidad, lo que sugiere un posible papel de variantes raras que se expresan en forma recesiva [106]. Por su parte, en diferentes estudios realizados en mellizos, se observó una mayor tasa de concordancia de CC en mellizos monocigóticos que en mellizos dicigóticos [107]. Varios estudios familiares indican un riesgo elevado de recurrencia entre hermanos que oscila entre 3.4 y 79.1 [70,108].

Entre los factores genéticos, las anomalías cromosómicas -que implican la pérdida o ganancia de cromosomas completos (aneuploidía) o cambios estructurales de las regiones subcromosómicas- son la primera causa reconocida de las CC y se detectan entre el 8% y el 13% de todos los pacientes con CC [50,52,70]. La frecuencia de hallazgos citogenéticos patológicos visibles en el cariotipo es aún mayor (del 17-22%) en fetos en donde se visualizan anomalías en la ecografía cardíaca [59]. Debido a la pérdida o ganancia de un cromosoma completo, un gran número de genes están desregulados, lo que da lugar a efectos graves y pleiotrópicos sobre el desarrollo [70] e implican, generalmente, enfermedades multiorgánicas en las que la cardiopatía es sólo parte de la afectación general. De hecho, Hartman y

colaboradores estudian una cohorte de 547 pacientes con CC con anomalías citogenéticas y prácticamente todos (~98%) tenían malformaciones extracardiacas [109].

La CC es una manifestación importante de muchos síndromes que involucran aneuploidías: se presenta del 40 al 50% de los pacientes con trisomía 21, del 20 al 50% en la monosomía del X y casi en el 100% de los pacientes que presentan trisomía 13 y trisomía 18 [70,110–114]. Además, la pérdida o ganancia del material genético -más precisamente la dosis alterada de muchos genes- afecta en gran medida la viabilidad, como lo demuestra la incidencia de CC del 33 al 42% en los fetos diagnosticados prenatalmente, en comparación con la incidencia de solo el 9 al 18% de CC en recién nacidos [115].

Aunque las CC que se deben a aneuploidías cubren una amplia gama de fenotipos, hay algunas lesiones que se asocian de manera más frecuente con anomalías cromosómicas específicas, como por ejemplo defectos del tabique AV en la trisomía 21. En estudios realizados en pacientes con trisomías parciales del cromosoma 21, se observó que los loci *DSCAM* (molécula de adhesión celular SD) y *COL6A2* (colágeno tipo VI) estarían relacionados a las CC observadas en este síndrome [116].

Otro tipo de anomalías las constituyen las variaciones en el número de copias o CNVs. Las CNVs son anomalías estructurales (perdidas o ganancias) de secuencias de ADN subcromosómicas, cuyo tamaño oscila entre 1 Kb y varias Mb. Si bien existen CNVs comunes en la población general, algunas pueden ser patogénicas, y tanto éstas como las benignas, pueden ser heredadas u ocurrir *de novo* debido a una recombinación incorrecta que se produce durante la meiosis. Las repeticiones en bajo número de copia (LCR, *low copy repeats*) y los transposones presentes en todo el genoma actúan como templados para la formación de CNVs [117].

Si bien las CNVs no constituyen una parte mayoritaria de las causas de las enfermedades genéticas, en la actualidad están bien caracterizadas varias CNVs involucradas en diferentes patologías. Para algunos síndromes, el cuadro clínico puede incluir el desarrollo de CC debido a que se encuentra alterada la dosis de genes contiguos. De hecho y en líneas generales, las CNVs son más frecuentes en aquellos pacientes con CC que poseen alguna otra malformación extracardiaca [59]. Diversos estudios dan cuenta de la presencia de CNVs patogénicas del 3 al 30% en pacientes que presentan una CC como parte de un síndrome, y del 3 al 10% entre pacientes con CC aislada [52,59].

Como ejemplo podemos nombrar una delección de 3 Mb en el brazo largo del cromosoma 22, Del22q11. Es la microdelección patogénica humana más frecuente, y se caracteriza porque los pacientes presentan un fenotipo variable que en algunos casos incluye CC, rasgos faciales característicos, inmunodeficiencia, hipocalcemia, deformaciones del paladar y trastornos del neurodesarrollo. Esta delección explica alrededor del 15% de los casos de niños que nacen con TDF [70] y entre un 13 y un 18% de los pacientes con cardiopatías conotruncuales [70,118–120]. Si bien en esta CNV estarían afectados más de 30 genes, a partir de estudios de secuenciación se postula que el fenotipo de la CC estaría relacionado principalmente a la hemigiosis del gen *TBX1*. Este FT es crucial para la proliferación celular en el CCS [121]. Otra CNV relacionada a CC que incluye un gen cuyo rol es conocido en el desarrollo del corazón en modelos animales, es una delección en 8p23 que contiene el FT *GATA4* [122].

En los últimos años varios estudios realizados en grandes cohortes de pacientes con CC dan cuenta de la presencia de varias CNVs recurrentes asociadas con la patología, así como de muchas CNVs raras y *de novo* asociadas a CC específicas (en general CC aisladas/no sindrómicas). Por ejemplo, se han descrito grandes CNVs *de novo* en lesiones del lado izquierdo, TDF y otros casos esporádicos [123,124].

El análisis de CNVs puede proporcionar información sobre genes no identificados previamente y el esclarecimiento posterior de su papel en la progresión de las CC, como fue el caso en su momento del gen *TBX1* (involucrado en el síndrome de Del22q11 nombrado previamente) o del gen *CHD7* en 8q12.1, involucrado en el síndrome CHARGE [125]. Teniendo en cuenta los genes que se encuentran involucrados en estos desbalances, el análisis de CNVs permite además identificar redes de desarrollo y vías biológicas. Por ejemplo, un estudio de CNVs realizado en una cohorte de 2500 pacientes con CC mostró que los genes de la vía de señalización de NOTCH-WNT estaban afectados. Si bien el rol de la vía de señalización de *Wnt* en el desarrollo cardíaco como regulador de la proliferación y diferenciación celular era conocido en organismos modelo, este estudio proporcionó la primera evidencia de esta vía de señalización en humanos [123]. De hecho, se estima que la contribución de la CNVs a la causalidad de las CC sería más frecuente de lo que se conoce actualmente porque las metodologías de identificación tienen limitaciones inherentes a la sensibilidad óptima de cada una [126].

Actualmente, el método por excelencia para iniciar los estudios moleculares de patologías de delecciones o duplicaciones conocidas, es la Amplificación Múltiple de Sondas dependiente de

Ligación (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* o MLPA). Es una técnica cuantitativa que permite la identificación tanto de deleciones como de duplicaciones y se suele utilizar como primera aproximación en CCC analizando la región 22q11 y otras regiones implicadas en este tipo de CC. Otra técnica utilizada para detectar CNVs, es la hibridación genómica comparada por microarreglos de ADN o array-CGH (*comparative genomic hybridization*). Esta metodología permite una valoración de todo el genoma en su conjunto para la búsqueda de microdeleciones y microduplicaciones genómicas en comparación con una muestra de referencia.

En alrededor del 5 al 20% de los pacientes, la aparición de la CC sería el producto de la alteración en un único gen [127–130]. Se estima que el 8% de los casos son atribuibles a variantes heterocigotas *de novo* mientras que el 2-3% se deben a variantes heredadas [101].

Muchas de estas variantes se asocian a síndromes monogénicos como el de Marfan, Smith-Lemli-Opitz, Ellis-van Creveld, de Holt-Oram, Noonan, entre otros. Sin embargo, algunas variantes puntuales en determinados genes pueden conducir también a la aparición de CC aisladas donde únicamente está afectado el corazón. El primer gen en el que se asoció la presencia de variantes deletéreas fue *NKX2-5* [131,132]. Hoy por hoy, y a pesar de que la lista de genes implicados en CC es dinámica, se estima que hay alrededor de 400 genes asociados a CC e incluso más si se tienen en cuenta los estudios realizados en ratones genéticamente modificados [26,52,129,133,134]. Generalmente, corresponden a genes involucrados en la regulación de la transcripción, en las vías de transducción de señales o bien con proteínas estructurales cardíacas. Algunos ejemplos son los genes *NKX2-5*, *NKX2-6*, *GATA4*, *GATA5*, *GATA6*, *IRX4*, *TBX1*, *TBX20*, *TBX5*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *ELN*, *CRELD1*, *VEGFA*, *TBX1*, *ISL1* entre otros [52,125,135–138].

La presencia de variantes patogénicas en genes que codifican FT, transductores de señalización celular y modificadores de cromatina pueden interferir con la especificación, diferenciación y patrones de tipo celular importantes en el desarrollo del corazón, lo que causa perturbaciones en la estructura y función del órgano. Como muchas de las proteínas codificadas por estos genes funcionan sinérgicamente o están conectadas por redes funcionales, esto sugiere que una amplia red de interacción se relaciona con el desarrollo de la enfermedad [133,139]. La presencia de variantes en genes específicos puede ser abordada mediante la amplificación de la región de interés seguida de secuenciación de Sanger. Actualmente, y con el número creciente de genes involucrados, la denominada secuenciación masiva (SM) se

aplica para la identificación de variantes en genes conocidos o bien para determinar genes nuevos relacionados a las CC.

La SM, también llamada paralela o de siguiente generación (*next generation sequencing*), establece un salto de varios órdenes de magnitud en la cantidad de genes que pueden ser estudiados en simultáneo. Mediante esta metodología es posible analizar el genoma completo, las secuencias codificantes del mismo (exoma), o bien un conjunto de varios genes candidatos implicados en una patología, lo que se conoce como secuenciación masiva dirigida (panel). De manera similar, los estudios genómicos de asociación (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome-wide association study*) involucran la comparación de variantes genéticas de diferentes individuos dentro de la población a los efectos de proponer si alguna/s variante/s se asocia/n con un determinado rasgo. También puede utilizarse para detectar múltiples factores de riesgo genéticos que contribuyen a las CC al comparar individuos afectados y no afectados [140]. Siendo las CC un grupo heterogéneo de enfermedades, los estudios de GWAS brindan también una idea de su etiología [141].

Es interesante destacar que a partir de los estudios genéticos en diferentes genes involucrados en CC, se observa que una misma variante patogénica puede originar diferentes malformaciones cardíacas, así como variantes deletéreas en genes diferentes pueden causar el mismo tipo de malformación cardíaca [125]. En conjunto, esto da como resultado una expresividad variable donde los sujetos con las mismas variantes pueden exhibir diferentes fenotipos, o una penetrancia incompleta donde algunos individuos con una variante patogénica conocida pueden inclusive no tener la enfermedad. La interacción gen-ambiente suma un factor más a la complejidad de la etiología de las CC y contribuye a explicar esta variabilidad [70]. En ciertos casos, variantes idénticas en diferentes individuos pueden no producir el mismo fenotipo, dependiendo, entre otros factores, del contexto genómico, el ambiente uterino fetal o la cardiomecánica individual [70]. Como resultado, las CC tienen en gran parte patrones de herencia no mendeliana y se describen mejor como mediadas por genética compleja [142].

Como se describió previamente, el desarrollo del corazón es un proceso altamente complejo que involucra una serie de eventos moleculares, celulares y morfológicos coordinados para generar un órgano funcional. Este proceso es regulado por una amplia variedad de genes que actúan en diferentes etapas del desarrollo. La pesquisa de variantes puntuales en genes asociados a cardiopatías congénitas resultaría imposible de realizar en su totalidad mediante

un único análisis debido a la variedad de causas etiológicas y a la cantidad de genes implicados en el desarrollo, diferenciación y funcionamiento del corazón.

Alteraciones en la expresión o función de estos genes puede llevar a la aparición de CC, que pueden ser leves o graves, según la naturaleza y la gravedad de la variante genética. Por lo tanto, la identificación y el estudio de los genes implicados en el desarrollo del corazón son fundamentales para entender las causas de estas patologías y para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Recientemente, gracias a los avances en el campo las nuevas tecnologías de secuenciación y a la disminución en sus costos, las tecnologías de SM se han transformado en una rápida, certera y costo-efectiva alternativa diagnóstica. Los estudios de paneles y secuenciación de exoma completo son las estrategias de SM más implementadas en el campo de la medicina en la actualidad. La utilización de técnicas de análisis masivos a nivel genómico permite una mejor comprensión de la diversidad genética en las CC y abre nuevas posibilidades para el diagnóstico y tratamiento personalizado de estas patologías.

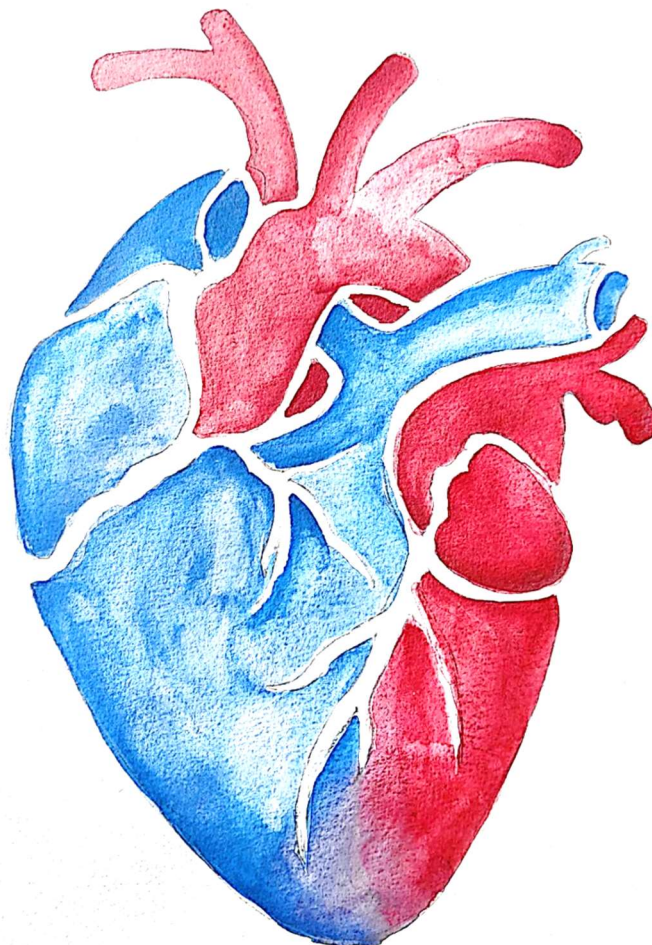
La comprensión de las causas hereditarias nos proporciona una idea de la base biológica de CC, permite la definición de riesgo de enfermedad como punto de partida para la prevención, así como comprender la biología del desarrollo del corazón. El estudio de la etiología de las CC es esencial porque puede predecir los resultados clínicos, conocer los riesgos genéticos reproductivos y detectar factores de riesgo genéticos dentro de las familias. Además, es importante investigar la correlación genotipo-fenotipo, ya que nos brinda la oportunidad de predecir el pronóstico, desarrollar y aplicar terapias oportunas. Por ejemplo, algunas CC pueden causar hipertensión pulmonar (HTP) por diversos mecanismos [143,144]. El tratamiento de la HTP asociada a CC se enfoca en abordar tanto la anomalía cardíaca subyacente como la HTP. En algunos casos, es necesaria una cirugía o un procedimiento intervencionista para corregir la CC y mejorar el flujo sanguíneo hacia los pulmones. Además, es posible prescribir medicamentos para dilatar los vasos sanguíneos pulmonares, reducir la presión arterial y mejorar la función cardíaca. Ciertos tipos de variantes están asociados con su rápido desarrollo como aquellas en el gen *BMPR2*, para las cuales se observó un mayor riesgo de desarrollar HTP en pacientes con CC. Estos hallazgos resaltan la importancia de evaluar el perfil genético de los pacientes y considerar el riesgo genético al diseñar estrategias terapéuticas personalizadas.

Descubrir una patogénesis genética de las CC es cada vez más relevante desde el punto de vista clínico. Para el médico que atiende a un niño o a un adulto con esta afección existen al menos 4 razones importantes para determinar la causa genética [50]:

1. evaluar los riesgos de recurrencia para la descendencia del individuo con CC, así como la descendencia de los padres u otros parientes cercanos;
2. evaluar las afecciones extracardiacas asociadas;
3. evaluar el riesgo de retraso en el desarrollo neurológico en recién nacidos y lactantes;
4. proporcionar un pronóstico más preciso para la CC y los resultados de las intervenciones relacionadas con las mismas.

-CAPÍTULO II-

MARCO TEÓRICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



II.1 MARCO TEÓRICO

Hoy en día los países de bajos y medianos ingresos aún se enfrentan a las llamadas enfermedades de la pobreza. Sin embargo, las enfermedades crónicas y los trastornos con base total o parcialmente genética representan también un problema de salud pública [145]. Dentro de estas entidades están incluidas las AC que constituyen todas las condiciones potencialmente patológicas (morfológicas y/o funcionales) que se originan antes del nacimiento y que incluyen los desórdenes causados por factores genéticos, ambientales, mixtos o desconocidos y que pueden ser evidentes desde el nacimiento o manifestarse más tardíamente en la vida. Teniendo en cuenta la prevalencia al nacimiento y al diagnóstico de patologías funcionales de aparición más tardía (ceguera, sordera, discapacidad intelectual, entre otros), la prevalencia de AC a los 5 años es de aproximadamente el 8% y explican la mayor parte de las internaciones en hospitales pediátricos [146].

Como se nombró previamente, en Argentina se estima una prevalencia de AC morfológicas detectadas al momento del nacimiento del 1.82% (reporte 2022 RENAC) [5]. Las AC incrementaron su importancia relativa en la mortalidad infantil (MI), pasando a ser en nuestro país su segunda causa y explicando el 27.94% de las defunciones en menores de 12 meses de vida [147]. Las CC son las AC más frecuentes, representando un tercio de estas anomalías [5]. Su prevalencia al nacimiento en el período 2009-2018 fue de 4.92 por 1000 nacimientos, y para las CC severas, de 1.15 por 1000 (RENAC comunicación personal). En nuestro país, las CC constituyen una de las principales causas de muerte prenatal, neonatal e infantil y de morbilidad en edad pediátrica [148]. Hacia el año 2013 nacían aproximadamente 700000 niños por año y de ellos, 6.100 presentaban CC (Programa Nacional de Cardiopatías Congénitas, 2013). Actualmente se reportan 7000 nacidos con CC por año [149].

Los defectos cardíacos pueden ocurrir en el contexto de malformaciones múltiples o, como en la mayoría de los casos, de forma aislada. Si bien un gran número de los recién nacidos con una CC no presentan una causa etiológica conocida para la malformación, tanto para casos sindrómicos como para los aislados se ha reportado recurrencia familiar, consistente con la influencia genética en el desarrollo de la patología [70,108].

En las últimas décadas la genética clínica ha adquirido una gran relevancia como consecuencia de los avances en el desarrollo de las técnicas diagnósticas, las cuales tienen un enorme impacto en la práctica médica y han permitido un progreso notable en la definición de síndromes

genéticos y detección de portadores, así como también, en la prevención, tratamiento y diagnóstico prenatal de los mismos. A pesar de la demanda asociada a la prevalencia de la CC, la oferta de diagnóstico genético de las mismas en nuestro sistema de salud a nivel público es deficiente. Por ejemplo, considerando que una de las causas genéticas más frecuentes de la CC conotronics es la delección 22q11, el estudio de la misma debería formar parte de los algoritmos diagnósticos. Sin embargo, sólo muy pocos hospitales ofrecen el diagnóstico de esta delección sin costo para el paciente. Este diagnóstico tampoco forma parte de un estudio sistemático de las causas etiológicas de las CC, probablemente por falta de información al respecto y/o por escasos recursos en el sistema de salud. De hecho, el diagnóstico de la delección 22q11 se realiza, en general, mediante la aplicación de la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH), que resulta muy costosa para ser implementada en el análisis de un número elevado de pacientes, a diferencia del costo-beneficio que resulta de aplicar, por ejemplo, el abordaje por MLPA [150]. Más aún, no era de nuestro conocimiento que se haya abordado, hasta el inicio de este trabajo de tesis, el análisis de otras anomalías genómicas como causa etiológica de las CC en pacientes de nuestra población.

En este contexto, nos propusimos un algoritmo de trabajo que nos permitiera estudiar a los pacientes comenzando por las alteraciones más frecuentes o previamente identificadas, para luego continuar profundizando la búsqueda de la alteración genética, basándonos en las metodologías y recomendaciones internacionales. En la primera parte del proyecto de tesis, se estudiaron las posibles causas cromosómicas de CC conotronics por técnicas de citogenética clásica, luego se investigó la presencia de la Del22q11, la CNV de presentación más común, y se prosiguió con la búsqueda de otros desbalances reportados en la literatura. Avanzando con el trabajo de tesis, ampliamos la inclusión a pacientes que presentaban todo tipo de CC, implementamos la búsqueda de CNVs en todo el genoma (luego de analizar la Del22q11 en CC conotronics) mediante la técnica de array-CGH en un grupo de pacientes con al menos otra anomalía mayor. Finalmente, y dado que está bien determinado que el desarrollo de las CC es heterogéneo con diversos y múltiples genes implicados, analizamos la presencia de variantes de secuencia en un conjunto de genes implicados en CC mediante técnicas de SM en un grupo seleccionado de pacientes.

II.2 HIPÓTESIS

Existen variantes de secuencia genética y desbalances genómicos cuyo potencial patogénico para la generación de ciertos defectos estructurales del corazón aún no ha sido determinado. El análisis de genes candidatos y de regiones genómicas en muestras de ADN proveniente de pacientes con cardiopatías congénitas permitirá identificar estas variantes y así incrementar el conocimiento acerca del rol de estos genes en la patología.

II.3 OBJETIVOS

II.3.1 Objetivo General

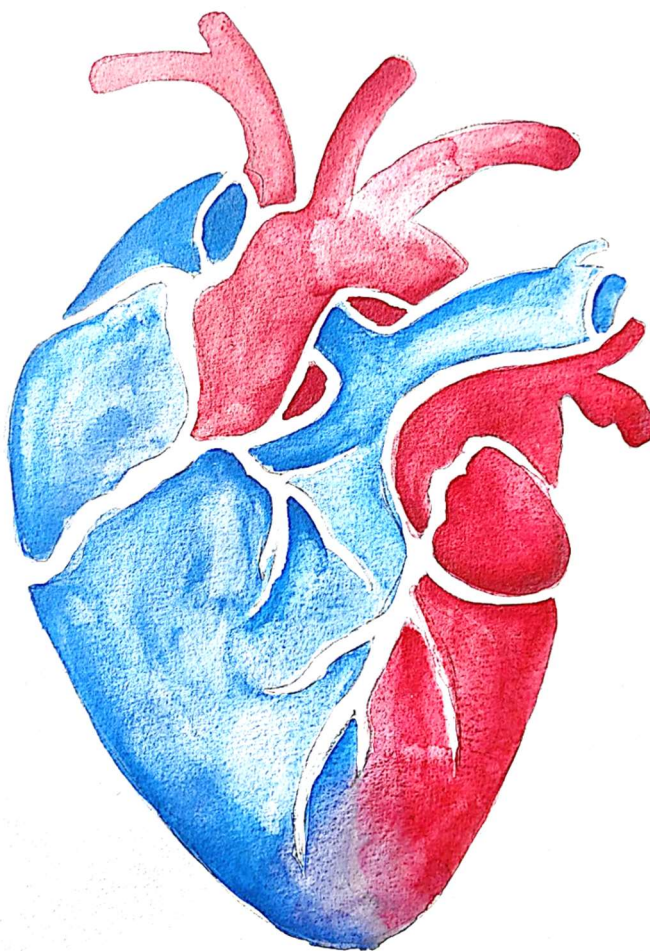
Identificar anomalías cromosómicas, desbalances genómicos y variantes de secuencia potencialmente deletéreas en recién nacidos y en niños afectados con CC de nuestra población.

II.3.2 Objetivos Específicos

1. Estimar la proporción de niños con CC que presentan anomalías cromosómicas desbalances genómicos u otras variantes genéticas.
2. Si se detectarán desbalances genómicos o variantes de secuencia no descritos previamente en la literatura, plantear su posible relación con la afección.
3. Describir su posible relación con el fenotipo clínico.

-CAPÍTULO III-

MATERIALES Y MÉTODOS



III.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todas las investigaciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo con los principios expresados en la declaración de Helsinki. Para todas las muestras incluidas, se solicitó la firma de un consentimiento informado por escrito del individuo (Ver modelo en el ANEXO I). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), Buenos Aires, Argentina (**Acta # 14, 16 de septiembre de 2013**).

III.2 MUESTRAS

La recolección de muestras de pacientes se realizó en dos etapas consecutivas que llamaremos grupo A y B.

III.2.1 Grupo A

Se estudiaron 80 pacientes de hasta 16 años con CC conotruncales (CCC) reclutados en el período comprendido entre mayo 2013 y mayo 2014 pertenecientes a los siguientes hospitales:

Hospital	Ciudad
1. Hospital de Niños Castelán	Resistencia, Chaco
2. Hospital Castro Rendón	Neuquén, Neuquén
3. Hospital Arturo Oñativía	Salta, Salta
4. Hospital Sor María Ludovica	La Plata, Pcia. de Buenos Aires

Todos los pacientes fueron evaluados por un médico genetista y un cardiólogo. Para cada paciente se completó una ficha clínica detallada (Anexo II), que en forma codificada fue volcada en una planilla unificada.

Criterios de inclusión:

Pacientes que presentaban CCC aislada o asociada a una o más anomalías congénitas mayores y/o menores de etiología no conocida.

Criterios de exclusión:

Pacientes que presentaron diagnóstico clínico compatible con un diagnóstico sindrómico específico (Ej: Trisomía 21, Síndrome Williams, etc.).

Se previó como posible sesgo la inclusión predominante de pacientes que presentaron anomalías mayores o menores asociadas a la Del22q11. A fin de evitar este sesgo, la inclusión

al estudio se realizó a partir de la detección de la cardiopatía congénita en los centros participantes.

Algoritmo de análisis:

Los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión fueron evaluados por médicos genetistas en una entrevista clínica. De cada paciente se extrajo una muestra de sangre periférica en 2 condiciones:

- 1) una parte anticoagulada con EDTA para estudios moleculares (MLPA) y
- 2) una parte anticoagulada con heparina para estudios citogenéticos de cariotipo y FISH.

A todos los pacientes se les realizó en paralelo los siguientes estudios:

- un análisis de cariotipo,
- MLPA con los kits P250 y P424,
- hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Todas las muestras que no presentaron una variante clínicamente relevante mediante los estudios anteriores fueron incluidas en el análisis de posibles variantes de secuencia en las regiones codificantes del gen *NKX2-5* mediante secuenciación de Sanger. Para un caso particular que poseía antecedentes familiares relacionados a la patología (SA12) se realizó un análisis de secuenciación de exoma y a continuación un array-CGH. En la Figura 6, se presenta un esquema general de trabajo.

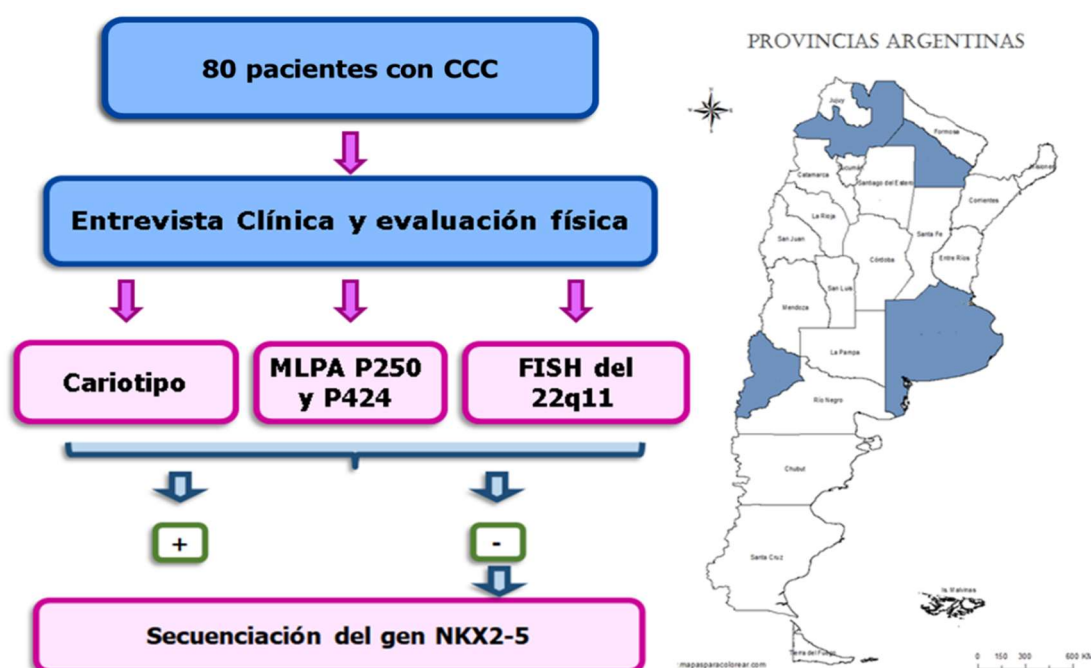


Figura 6 Algoritmo de análisis del grupo A. MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; FISH: *Fluorescent in situ Hybridization*

III.2.2 Grupo B

Se estudiaron 254 muestras de recién nacidos o de niños hasta 16 años con cardiopatías congénitas (CC) en el período comprendido entre junio 2015 y septiembre 2019 pertenecientes a los siguientes hospitales:

Hospital	Partido
1. Hospital Presidente Perón	Avellaneda
2. Hospital Dr. Pedro	Avellaneda
3. Hospital Especializado Materno Infantil de Agudos Ana Goitia	Avellaneda
4. Hospital Interzonal De Agudos Evita	Lanús
5. Hospital Zonal General de Agudos Dr. Narciso López	Lanús
6. Hospital Luisa C. de Gandulfo	Lomas de Zamora
7. Hospital Materno Infantil Oscar Alende	Lomas de Zamora
8. Hospital Zonal General de Agudos Mi Pueblo	Florencio Varela
9. Hospital Dr Arturo Oñativia	Almirante Brown

Hospital	Partido
10. Hospital Zonal General de Agudos Dr. Lucio Meléndez	Almirante Brown
11. Hospital Evita Pueblo	Berazategui
12. Hospital Isidoro Iriarte	Quilmes
13. Hospital Subzonal Materno Infantil Dr. Eduardo Oller	Quilmes
14. Hospital Zonal General de Agudos Dr. Alberto Antranik Eurnekian	Ezeiza
15. Hospital Municipal Santamarina	Esteban Echeverría
16. Hospital Materno Infantil Ramón Sardà	Ciudad Autónoma de Buenos Aires
17. Hospital De Niños Sor María Ludovica	La Plata
18. Hospital Municipal Materno Infantil de San Isidro	San Isidro

Todos los pacientes fueron evaluados por un médico genetista y un cardiólogo. Para cada paciente se completó una ficha clínica detallada (Anexo II), que en forma codificada fue volcada en una planilla unificada.

Criterios de inclusión:

pacientes que presentaron:

- CC aislada o asociada a una o más anomalías congénitas mayores y/o menores de etiología no conocida.
- CC asociada a una o más anomalías congénitas mayores y/o menores de etiología no conocida que presentaban una anomalía cromosómica pero que no explicaba el fenotipo, o con anomalías cromosómicas en los que era necesario definir con más precisión la identidad de esa anomalía.
- CC asociada a una o más anomalías congénitas mayores y/o menores de etiología no conocida en la que no fue posible realizar el estudio citogenético por ausencia de muestra o por fracaso de la técnica.

Criterios de exclusión:

- Fetos muertos.
- Presencia de ductus en recién nacidos menores a 37 semanas de gestación o de foramen oval.
- Pacientes cuyos padres o representantes legales no otorgaron el consentimiento para participar en el estudio.
- Diagnóstico clínico de trisomía 21.

- Anomalía cromosómica detectada por estudios citogenéticos que se correspondiera con el fenotipo (trisomía 18, trisomía 13, etc.).

Algoritmo de análisis:

Los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión se extrajo una muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA para estudios moleculares.

A todos los pacientes que presentaban CC conotroncales y aquellos con sospecha de síndrome de DiGeorge (SDG) se les realizó un análisis de MLPA con el kit P250. Aquellos pacientes sin desbalances detectables por MLPA o que no poseían criterios de inclusión para este análisis, fueron reagrupados en conjunto con los médicos genetistas para organizarlos según si poseían un fenotipo compatible con una causa génica/sindrómica o si tenían un fenotipo que sugiriera un posible desbalance genómico.

Los pacientes con sospecha de un síndrome génico fueron estudiados por SM y aquellos con sospecha de desbalance genómico por array-CGH. Si fuera necesario, los estudios se completaron mediante otras técnicas (secuenciación de Sanger, array-CGH o SM)

Las variantes halladas por SM se confirmaron por secuenciación de Sanger y en los casos en que se dispusiera de las muestras de los padres -y si así lo consintieron- se analizó la segregación familiar. En forma análoga se procedió para aquellas CNVs de significado incierto y/o patogénicas en caso de requerir el análisis de muestras parentales.

En un caso particular, se estudió una muestra de líquido amniótico a partir de la sospecha de la presencia de la misma anomalía congénita de una hermana fallecida incluida en este estudio. La muestra fue tomada al realizarse la punción de rutina para el estudio citogenético prenatal. En el caso particular de esta muestra posterior a la extracción de ADN se realizó un análisis de VNTRs (ver en III.7.1.2. Amplificación de VNTRs) para descartar la posibilidad de contaminación con células maternas.

En la Figura 7 se presenta un esquema general del trabajo para este grupo de pacientes.

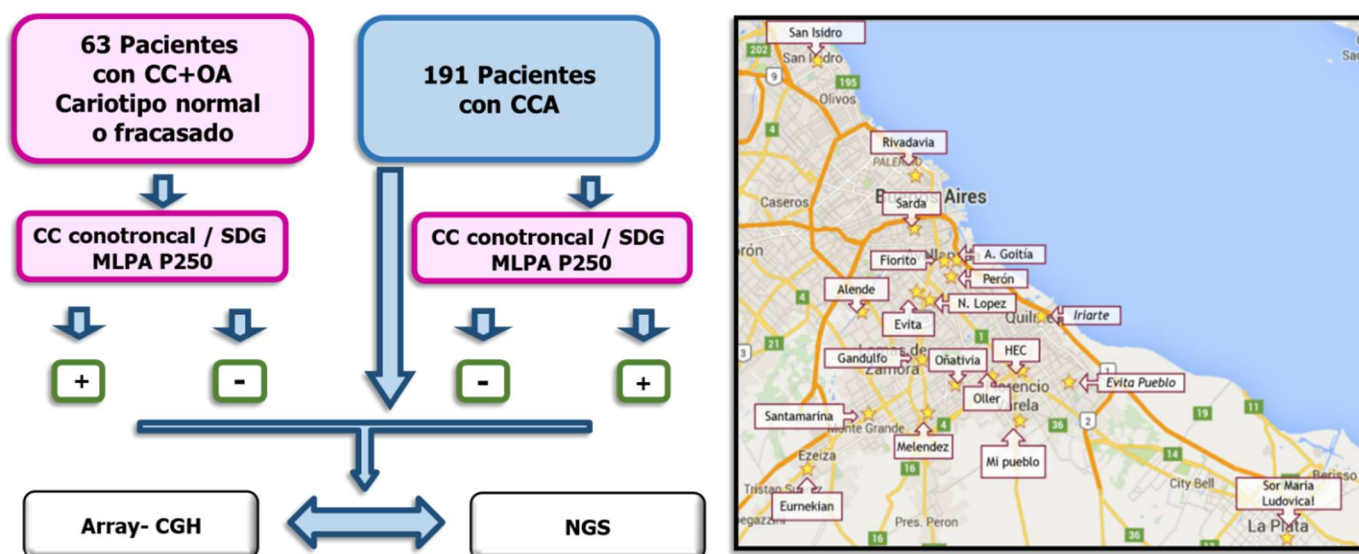


Figura 7: Algoritmo general de trabajo para los pacientes del grupo B. CC Cardiopatía congénita. OA: Otras anomalías, SDG: Síndrome de DiGeorge. MLPA: *Multiplex Ligation-dependent probe amplification*. SM: Secuenciación masiva. A la derecha, mapa de la región sanitaria VI de la Provincia de Buenos Aires con los hospitales incluidos en el proyecto.

III.3 TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

III.3.1 Extracción de sangre

Según el grupo de estudio de cada paciente se extrajeron una o dos muestras de 0,5 a 5 mL de sangre periférica:

- 1) anticoagulada con EDTA al 5% para estudios moleculares (grupo A y B)
- 2) anticoagulada con heparina para estudios citogenéticos de cariotipo y FISH (sólo grupo A)

III.3.2 Extracción de líquido amniótico

En algunos casos específicos, se realizó una toma de líquido amniótico (LA) para realizar los estudios. Para tal fin, se extrajeron 15 mL de LA mediante punción en la semana 28 de gestación con jeringa Terumo seca y estéril.

III.4 EXTRACCIÓN DE ADN

III.4.1 De sangre periférica

Se tomaron 5 mL de sangre periférica y se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL (para volúmenes menores se realizó en cantidades proporcionales a la muestra obtenida). Se agregó solución de lisis RBC (de las siglas en inglés de *red blood cell*), hasta llenar el tubo. Las

muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm (radio: 8 cm). Los lavados con RBC y la centrifugación se repitieron hasta que la solución no tuviera coloración roja. Una vez obtenido un pellet limpio, se descartó el sobrenadante. Luego se agregaron 3 mL de buffer TEN (Tris-EDTA-NaCl) para resuspender el pellet. Se adicionaron 20 µL de Proteinasa K (20 mg/mL) y 200 µL SDS 10 % o 100 µL de SDS 20%. Se incubó durante toda la noche (ON) a 37°C con agitación. Luego de la incubación, se agregó 1 mL de NaCl 5M y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó la solución durante 10' a velocidad máxima. El sobrenadante se pasó a un tubo de 15 mL y se agregaron 2 volúmenes de etanol 100%. Se agitó la mezcla hasta que el ADN estuviese completamente precipitado. El ADN se extrajo de la solución con una pipeta de vidrio. Luego se sumergió la pipeta en etanol 70 % (3 veces) y se dejó secar hasta que el ADN se tornó transparente. El ADN se resuspendió en buffer TE (Tris-EDTA) o agua destilada a 37°C ON, de manera de obtener una concentración de aproximadamente 50 -100 ng/µL. La solución de ADN así obtenida se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm (1 OD = 50 µg/mL). Una relación 260/280 mayor a 1.7 se consideró como adecuada para los estudios.

Véase la preparación de soluciones en el ANEXO III.

III.4.2 De líquido amniótico

Para una mejor extracción de ADN se procedió a realizar un cultivo celular. Brevemente, se homogeneizó suavemente el contenido de la jeringa por inversión y se dividió la muestra en 2 tubos Falcon de 15 mL estériles. Se centrifugaron 30 min a baja velocidad (1000-1200 rpm radio: 8 cm). Se descartó el sobrenadante por volcado dejando aproximadamente 2 mL y se resuspendió el pellet.

Se procedió a la siembra del pellet resuspendido en 3 frascos de cultivo estériles (*Cell culture Flask 25cm², Plug CAP, Tissue Culture Treated*). El volumen resuspendido de uno de los Falcon de 15 mL se sembró en un frasco con 3 mL de Amniomax: (BIO_AMF tm - 2:AmnioMAX™—II *Complete Medium* con gentamicina y L- glutamina). El volumen resuspendido del otro Falcon de 15 mL se sembró en 3 mL de medio F10 con 1 mL de Suero fetal bovino (SFB). Se incubaron los frascos a durante 1 semana a 37°C, 5% CO₂. Al 7° día se procedió a la observación en microscopio invertido para evaluar evolución del cultivo (células adheridas, formación de colonias, células que no se adhirieron, hematíes y/o posible contaminación.)

Se realizó un cambio de medio respetando la combinación original en cada frasco. Al día 14 se procedió a cosechar las muestras: se precalentó a 37°C 5-6 mL de solución hipotónica de citrato de Na al 0,7% y 1 mL de tripsina Versene para la cosecha. Se trasvasó el sobrenadante a un tubo Falcon de 15 mL rotulado con el N° de cultivo. Se agregó al frasco de cultivo 0.5 mL de

tripsina Versene y se dejó reposar 1'30" al calor del mechero para luego observar al microscopio si se despegaron las colonias. Se enjuagó el frasco con el sobrenadante para frenar la acción de la tripsina y se volvió a trasvasar todo el contenido al Falcon de 15 mL. Se centrifugó 20' a 1000 rpm (radio: 8 cm). Finalmente se descartó el sobrenadante.

Las muestras se centrifugaron durante 15' a velocidad máxima, se retiró el volumen sobrenadante con pipeta pasteur y se descartó. Se agregaron 1.2 mL de solución fisiológica (SF), se mezcló por inversión cuidadosamente y se centrifugó durante 15' a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante con pipeta pasteur y se repitió el lavado. Se agregaron 400 µL de WCLB (10mM de Tris-HCl, 10mM EDTA y 50 mM NaCl) y 2 µL de proteinasa K y se incubó ON en baño de agua a 55°C.

Se prepararon 4 tubos eppendorf de 1.5 mL rotulados (LA, descarte 1, 2 y 3). En el tubo LA se colocó la muestra incubada ON y se agregan 400 µL de fenol equilibrado a pH 8, se mezcló por inversión 8' y se centrifugó 8' a 8000 rpm (radio: 8 cm).

Se retiró el líquido de la fase de abajo con una jeringa y se pasó al tubo eppendorf 1 (se cambió todas las veces de acá en adelante la aguja). Se agregó 200 µL de fenol y 200 µL de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1) al eppendorf LA. Se dejó reposar en posición oblicua 8', luego se centrifugó 8' a 8000 rpm (radio: 8 cm). Se volvió a retirar el líquido de la fase de abajo y se pasó al tubo eppendorf 2. Se repitió el procedimiento y se pasó la fase superior al tubo eppendorf 3.

Al eppendorf 3 se le agregaron 800 µL de etanol al 100% y 37,8 µL de NaCl 4N, se mezcló por inversión hasta ver precipitar el ADN. Se tomó el ADN con pipeta pasteur y se pasó a un nuevo tubo eppendorf y se agregó 700 µL de etanol 70%. Se dejó reposar 15' y se centrifugó 1' a 1500 rpm (radio: 8 cm). Se descartó el sobrenadante y se dejó secar y para luego agregar 50 µL de buffer TE.

Véase la preparación de soluciones en el ANEXO III.

III.5 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y DE FISH

En el caso del grupo A, los cultivos de linfocitos para estudios citogenéticos fueron realizados en los laboratorios de cada hospital de origen.

En todos los casos, se estableció un cultivo de corto término a partir de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina y tratados con colchicina, según los métodos desarrollados en cada laboratorio y se determinó el cariotipo de cada paciente luego del análisis en promedio de 25 metafases.

Para la técnica de FISH se analizó la Del22q11 mediante el kit comercial con sondas fluorescentes LSI DiGeorge/VCFS region (TUPLE1) (Vysis, Downers Grove, IL, USA). En el caso de las muestras de Chaco y Neuquén se enviaron al CNGM los precipitados de células obtenidas luego del cultivo de linfocitos para la realización del estudio de FISH.

III.6 ESTUDIOS DE *MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION* (MLPA)

III.6.1 *Fundamentos de la técnica*

La técnica de MLPA está diseñada para analizar microduplicaciones y microdeleciones en regiones específicas del genoma relacionadas con diferentes patologías. Brevemente, el MLPA utiliza dos hemisondas para cada región a analizar las cuales hibridan de modo adyacente entre sí, dejando sólo un *nick* entre ambas. Las hemisondas cuentan con una región específica complementaria a la secuencia de interés y una región complementaria a *primers* universales, uno de los cuales está marcado con un fluoróforo. Además, una de las hemisondas contiene una secuencia de longitud variable o *stuffer*, la cual permite diferenciar los productos de amplificación de cada región por tamaño.

Esta técnica consta de 3 pasos principales: *i.* la hibridación de las sondas, *ii.* su ligación y *iii.* la PCR de los oligonucleótidos ligados. Únicamente serán amplificadas las sondas que se ligaron y, por ende, aquellas que fueron capaces de hibridar. Los productos de PCR son analizados por electroforesis capilar en un analizador de fragmentos que permite separar las diferentes regiones en estudio de acuerdo al peso molecular de cada amplicón. Finalmente, el número de copias de cada región en estudio se determina mediante la comparación relativa de la altura de los picos. En la mezcla de sondas se incluyen varias sondas que hibridarán a regiones sin desbalances que conjuntamente con la inclusión de individuos controles (es decir que no poseen desbalances en la región analizada) que se analizan en paralelo, servirán para normalizar y establecer la presencia o no de duplicaciones o deleciones.

III.6.2 *Metodología*

Para cada ensayo de MLPA se midió la concentración de ADN de cada muestra a analizar y 3 referencias de ADN de individuos controles. Se prepararon diluciones (con agua destilada de ampolla apirógena y estéril) para llevar las muestras y las referencias (controles) a una concentración final de 20 ng/μL. Se homogeneizaron con vortex y se centrifugaron. Se tomaron

5 μL y se desnaturalizaron 5' a 98°C y luego se bajó la temperatura a 25°C. En este momento se agregó a cada tubo, 3 μL de la siguiente mezcla de hibridación que se proveen en el kit:

Salsa MLPA buffer	1.5 μL
Mix de sondas	1.5 μL

Para el análisis de pacientes con sospecha de CC conotruncales o SDG la mix de sondas utilizadas fueron las de los kits P250-B1 o P250-B2 (MRC-HOLLAND, The Netherlands).

En el grupo A, se analizaron las muestras de 40 pacientes con el kit MLPA SALSA P424 que posee sondas para otras regiones asociadas a CC no contempladas en P250. Por otro lado, se utilizaron los kits P70 y P36 que poseen sondas subteloméricas para corroborar desbalances hallados por otra técnica o para confirmar/descartar sospechas clínicas en casos específicos.

Una vez agregada la mezcla se continuó el programa en el ciclador 1' a 95°C y después a 60°C entre 16 y 20 hs. Pasado este tiempo, se preparó la mezcla de ligación incorporando primero los buffers de ligación con el agua, luego se homogenizó con vortex y finalmente se agregó la ligasa 65.

Condición por tubo:

Ligasa A Buffer	3 μl
Ligasa B Buffer	3 μl
H ₂ O	25 μl
Ligasa 65	1 μl

Se bajó la temperatura a 54°C para agregar los 32 μl de la solución de ligación mezclando por pipeteo un mínimo de 15 veces por tubo. Luego se mantuvo la temperatura en 54°C 15 min, seguidos por 5 min a 98°C; luego la temperatura se mantuvo a 25°C.

A continuación, se preparó la mezcla de amplificación que contiene los cebadores (que son comunes a todos los fragmentos) agua y polimerasa.

Condición por tubo:

H ₂ O	7.5µl
Primer mix	2µl
Salsa polimerasa	0.5µl

Se sacaron los tubos del ciclador para luego agregar la mezcla de amplificación. A continuación, se configuro la tapa del ciclador a 105°C, para luego iniciar el programa de amplificación.

Las condiciones de los ciclos de amplificación fueron las siguientes: 35x (95°C 30'', 60°C 30'', 72°C 60''), 72°C 20', 15°C ∞.

Visualización de los fragmentos amplificados

Se preparó una placa de 96 pocillos con una mezcla de electroforesis conteniendo las muestras a analizar, buffer de corrida y un marcador de peso molecular fluorescente

Condición por pocillo:

Producto de PCR	0.7 µl
LIZ GS 600 (marcador de peso molecular)	0.3 µl
HiDi formamida	9 µl

Previo a la electroforesis capilar, la placa fue sometida a 95°C 3', 4°C 2'. La corrida electroforética se realizó en un secuenciador Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer con un voltaje y tiempo de inyección de 1600 volts 15''.

Análisis de resultados: La

La presencia de delciones y duplicaciones se realizó utilizando el software Coffalyser, desarrollado por la empresa MRC- Holland (<https://www.mrcholland.com/technology/software/coffalyser-net>)

III.7 ANÁLISIS DE VARIANTES EN GENES Y REGIONES DE INTERÉS

Los genes y regiones de interés fueron amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para el posterior estudio de variantes puntuales por secuenciación de Sanger o el análisis de VNTR (número variable de repeticiones en tándem), a saber:

- Estudio de variantes de secuencia en el gen *NKX2-5*.
- Estudio de variantes de secuencia en el gen *TBX1* para confirmar delección detectada en una sola sonda por MLPA.
- Confirmación de variantes halladas mediante SM en pacientes y familiares disponibles para evaluar segregación.
- Estudio de contaminación de ADN materno en muestra prenatal de líquido amniótico mediante análisis de VNTRs.

III.7.1 Amplificación por PCR

III.7.1.1 Regiones de interés para posterior secuenciación

En la Tabla 3 se describen los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación de los fragmentos amplificados para posterior secuenciación de Sanger. Se utilizaron concentraciones estándares de dNTPs (25mM) en los casos que no fueran incluidos en el buffer de la polimerasa, cebadores F y R 10mM, 1µL de templado (ADN) y el volumen final de reacción fue de 50µL.

Tablas 3: Cebadores utilizados para los fragmentos a secuenciar.

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
NKX2.5-1F	AAACTGCTCATCGCTCCTGT	638	55
NKX2.5-1R	CTGAGTTTCTTGGGGACGAA		
NKX2.5-2F	GAAAGTGGAGTCTGGGATCG	381	53
NKX2.5-2R	GCCTCTGCTCCTCAACAAAC		
NKX2.5-3,1F	CCAGAGCATCACCTGGTTTT	725	59.2
NKX2.5-3.1R	CGAGTCCCCTAGGCATGG		
NKX2.5-3.2F	GTGCTGAAACTCACGTCCAC	751	61
NKX2.5-3.2R	GAGCTCAGTCCCAGTTCCAA		
EP300-E31-F	CTCCCAAATCAGGCCAGTC	661	60
EP300-E31-R	TCCAGTGCACACTTGAACC		
MYH11-E26-F	TAAGGTGCTGTTTCATCGGGA	499	60
MYH11-E26-R	GAACAGGGTCGAGAAGGCTT		
MYH7-E7-9-F	CTGATTTGAGGCTTGCTGGT	728	60
MYH7-E7-9-R	CACCTAGCCATGCAGAGACA		
MYH7-E21 y 22F	AGGTAGGAAGGAGGCAGGAG	370	55
MYH7-E21 y 22R	CAGGGTTGTGGGAAGTGAAG		

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
MYH6-F	GAAAAGGGAAAGCAGGTACA	581	55
MYH6-R	TGGTCTGCTCCATGTTCTTCT		
VEGFA-E1-F	TCCAACCTTCTGGGCTGTTCT	595	59
VEGFA-E1-R	CCCTGCACCTAAGACGACAG		
TBX1-E7F	CTAGGGAACCCGCTCTGTTC	592	60
TBX1-E7R	CCGGCCCTACCTTTCTCC		
RAF1-e7F	AGCCTAAGTGCCAATCATGG	510	59
RAF1-e7R	CCCACACCAAACTAACTGC		
PTPN11-E3F	CGTTCCTTGGGTTTCTTTCA	417	55
PTPN11-E3R	TCACAAGCCTTTGGAGTCAG		
PTPN11- E8-9-F	TGGACTAGGCTGGGGAGTAA	671	62
PTPN11- E8-9-R	ACAAATCCATGGAGCCAAGA		
PTPN11-E12F	TCTGTCCAACCAGCACTCTG	456	55
PTPN11-E12R	CCAGACTGTTTTCTGTGAGCA		
COL5A1-E61F	TACAGGGGTCTCTGCCATTC	414	59
COL5A1-E61R	CTGTTCTTCTCAGGGCCAAT		
MYBPC3-E23F	GGTCCCGTGACAAAGCTAGA	449	59
MYBPC3-E23R	TTGTGAGTGGCTGAATGAG		
F-KAT6Be18	CAGAAATCTCCACGGAAAA	577	60
R-KAT6Be18	GCAATCTGTGGACTTTGGT		

Se realizó la polimerización en ciclador térmico con el siguiente ciclado para todas las muestras: 94°C 2', (94°C 30'', Temperatura de hibridación °C 30'') x 35, 72°C 7', 15°C ∞.

Durante todo el programa la tapa del ciclador se encontraba a 99°C. En todos los casos, los fragmentos obtenidos por PCR fueron revelados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con 4 µL de bromuro de etidio cada 100 mL de gel.

III.7.1.2 Amplificación de VNTRs

Los VNTRs (*variable number of tandem repeats*) son regiones del ADN que contienen un número variable de copias de una secuencia corta de nucleótidos repetidas en tándem. Debido a que cada individuo tiene un perfil único, los VNTRs son marcadores moleculares (secuencias de ADN que se utilizan para identificar y caracterizar diferentes tipos de variaciones genéticas) y son útiles para la identificación de personas y para la detección de la contaminación en las muestras de ADN. Los VNTRs se han utilizado en el contexto de la genética prenatal para detectar la posible presencia de ADN materno en las muestras de vellosidades coriónicas o

líquido amniótico. Esta presencia sería el producto de una contaminación al momento de realizar la punción y puede dar lugar a interpretaciones erróneas.

En esta tesis se analizó una muestra de vellosidades coriónicas, por lo que se incluyó el análisis de los VNTRs PentaE, THO1 y D16S539 para descartar posible contaminación materna, ya que se demostró que estos VNTRs son altamente informativos para la identificación de individuos y la detección de contaminación en la muestra de ADN fetal con alta resolución y precisión [151–153].

En la tabla 4 se describen los cebadores utilizados para el análisis de VNTRs, y la temperatura de hibridación utilizada para su amplificación.

Se utilizaron 0.25µL de la polimerasa de Bioline con su buffer comercial, cebadores F y R 10mM y 1µL de la dilución del templado (ADN) a 50ng/µL, a un volumen final de reacción fue de 25µL.

Tabla 4: Cebadores utilizados para la amplificación de VNTRs.

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño aproximado del fragmento (pb)
PentaE-F	ATTACCAACATGAAAGGGTACCAATA	379
PentaE-R FAM	TGGGTTATTAATTGAGAAACTCCTTACAATTT	
D16S539-F	GGGGGTCTAAGAGCTTGTA AAAAG	288
D16S539-R FAM	GTTTGTGTGTGCATCTGTAAGCATGTATC	
THO1-F FAM	GTGATTCCCATTGGCCTGTTC	168
THO1-R	ATTCCTGTGGGCTGAAAAGCTC	

Se realizó la polimerización en ciclador térmico con el siguiente ciclado para todas las muestras: (96°C 10'', 50°C 5'', 60°C 4') x 44, 15°C ∞.

Durante todo el programa la tapa del ciclador se encontraba a 99°C. En todos los casos, los fragmentos obtenidos por PCR fueron revelados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con 4 µL de bromuro de etidio (10mg/mL cada 100 mL de gel).

III.7.2 Purificación de los fragmentos de PCR para secuenciación

Una vez realizada la reacción de amplificación, los productos de PCR se purificaron mediante columnas Bioneer para su posterior estudio de secuenciación de Sanger de acuerdo a las

recomendaciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 5 volúmenes de buffer 1 al producto de PCR (45 µL luego de la electroforesis en gel de agarosa) y se mezcló por agitación. El volumen total se pasó a la columna de purificación rotulada y ensamblada en un tubo colector y se centrifugó durante 1' a 14000 rpm (radio: 8 cm).

Se añadieron 500 µL de solución buffer 2 a la columna y se centrifugó durante 1' a 14000 rpm (radio: 8 cm). Se desechó la solución eluída en el del tubo colector y se volvió a ensamblar la columna en el mismo. Se repitió el lavado con 500 µL de solución buffer 2 y se centrifugó durante 1' a 14000 rpm (radio: 8 cm).

Se pasó la columna a tubos de 1.5 mL previamente rotulados y se agregaron 30 µL de buffer 3. Se cuantificó el producto mediante NanoDrop™ 2000.

III.7.3 Secuenciación de Sanger

Una vez amplificado y purificado el fragmento deseado se realizó la reacción de secuenciación utilizando la siguiente condición de reacción por tubo:

H ₂ O	7 µL
<i>BigDye</i>	1 µL
Cebador (<i>forward o reverse</i>)	1 µL
Producto de PCR	1 µL

Se realizaron 2 mix separadas, una con el cebador *forward* y otra con el *reverse* para cada fragmento de interés. La polimerización se llevó a cabo en ciclador térmico (96°C 10'', 50°C 5'', 60°C 4') x 44, 15°C ∞. Durante todo el programa la tapa del ciclador se encontraba a 99°C.

III.7.4 Purificación con etanol del producto secuenciado

Al total de la reacción de secuenciación (10 µL) se le agregaron 32 µL de etanol al 95%. Se vortexeó al máximo de velocidad y se incubaron 15' a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 14000 rpm (radio: 8 cm) por 20' a 4°C. Se tomó con pipeta el sobrenadante sin tocar la pared donde precipita el pellet. Se agregaron 250 µL de etanol al 70% y se mezcló suavemente por inversión. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm (radio: 8 cm) por 10'. Se tomó con pipeta el sobrenadante sin tocar la pared donde precipita el pellet y se repitió la centrifugación a 14000 rpm (radio: 8 cm) por 10 minutos, descartando el sobrenadante y dejando secar los tubos abiertos en oscuridad por 10' a temperatura ambiente.

III.7.5 Electroforesis Capilar

Los fragmentos purificados luego de realizar la reacción de Sanger, así como los fragmentos amplificados para la evaluación de VNTRs se analizaron por electroforesis capilar.

III.7.5.1 Electroforesis Capilar-Secuenciación de Sanger

Para la evaluación de variantes puntuales por secuenciación de Sanger, se resuspendieron las reacciones de secuenciación purificadas con etanol en 10 µL de HiDi formamida para luego sembrarlos en una placa de 96 pocillos.

Previo a la electroforesis capilar la placa fue sometida a 95°C 3', 4°C 2'. La corrida electroforética se realizó en un secuenciador Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer con un voltaje y tiempo de inyección de 1600 volts 15''.

Programa de corrida de secuencias de Sanger

Polímero: POP7 Dye set: Z

Largo del capilar: 50 cm

Temperatura del horno: 60°C

Tiempo de corrida: 5760''

Voltaje de corrida: 8,5 KVolts

Voltaje de inyección: 1,6 KVolts

Tiempo de inyección: 5''

III.7.5.2 Electroforesis Capilar-VNTRs

Para la evaluación de VNTRs se preparó una placa de 96 pocillos con una mezcla conteniendo la muestra a analizar, buffer de corrida y un marcador de peso molecular fluorescente. Los mismos fueron sembrados por duplicado sin diluir y en una dilución de 1/10.

Condición por pocillo:

Producto de PCR	0.7 µL
LIZ GS 600 (marcador de peso molecular)	0.3 µL
HiDi formamida	9 µL

Previo a la electroforesis capilar la placa fue sometida a 95°C 3', 4°C 2'. La corrida electroforética se realizó en un secuenciador Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer con un voltaje y tiempo de inyección de 1600 volts 15''.

Programa de corrida de VNTRs

Polímero: POP7 Dye set: G5_2

Largo del capilar: 50 cm

Temperatura del horno: 60°C

Tiempo de corrida: 2000''

Voltaje de corrida: 15 KVolts

Voltaje de inyección: 1,6 KVolts

Tiempo de inyección: 15''

III.7.6 Análisis de resultados de electroforesis capilar

Los archivos de secuencias obtenidos del ABI 3500 se analizaron con los softwares FinchTV y Mutation Surveyor (SoftGenetics, LLC.) comparando las secuencias obtenidas con su secuencia de referencia

El análisis del tamaño de los fragmentos VNTRs se analizó con el programa GeneMarker® (SoftGenetics, LLC.)

III.8 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA CON MICROARREGLOS DE ADN (ARRAY-CGH)

III.8.1 Fundamentos de la técnica

Esta metodología se aplica para el análisis de CNVs y permite una valoración de todo el genoma en su conjunto para la búsqueda de microdeleciones y microduplicaciones genómicas.

Brevemente, la técnica consiste en la hibridación conjunta de ADN del paciente en estudio y un ADN de referencia -marcados con fluoróforos diferentes- a sondas depositadas en un soporte físico (array). Finalizada la hibridación, se realiza un escaneo del array para luego analizar la relación de la intensidad de fluorescencia de ambas muestras para cada sonda. De esta forma se puede determinar si hay una ganancia o pérdida del número copias en una región particular

del genoma. Se considera que existe una delección cuando se detecta una intensidad de fluorescencia reducida de la muestra en estudio en comparación con la muestra de referencia, mientras que una intensidad de fluorescencia aumentada de la muestra del paciente en comparación con la muestra de referencia se asocia con una ganancia del número de copias en esa región.

En este trabajo, los experimentos de array-CGH fueron realizados mediante un microarreglo de ADN comercial 8X60K de Agilent Technologies (G4450A, Santa Clara, CA, USA) utilizando todos los reactivos recomendados por el fabricante y acorde a sus indicaciones. A continuación, se describe el protocolo.

III.8.2 Cuantificación y análisis de calidad del ADN

Para esta técnica es crucial la evaluación adecuada de la cantidad y calidad de la muestra. El ADN debe ser de alta calidad, debe estar libre de contaminantes como carbohidratos, proteínas y restos de solventes orgánicos, estar intacto y poseer una degradación mínima. Con este fin, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 para evaluar la concentración y pureza del ADN y un gel de agarosa para evaluar la integridad.

Se registró la relación A260/A280 y A260/A230 para determinar la calidad de las muestras. Una relación A260/A280 entre 1.8 y 2 indica una buena extracción con ausencia significativa de proteínas. Una relación 260/230 da información sobre la presencia de contaminantes que influyen en la absorbancia a 260 nm. Una relación ideal de 260/230 para ADN puro es >2.0, y si bien una relación >1.5 puede utilizarse, en este trabajo se dio prioridad a las muestras que presentaron una relación 260/230>2.0

El estado de degradación del ADN se evaluó cualitativamente mediante la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñidos con 4 µL de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 50 volts durante 4hs.

III.8.3 Digestión enzimática de las muestras de ADN

Un primer paso para la realización de esta técnica es digerir el ADN con enzimas de restricción. Para el análisis utilizando los vidrios elegidos de 8x60K se necesitan de 0.2 µg de ADN por reacción. Se preparó una alícuota de cada muestra diluida convenientemente y luego se colocaron 10.1µL de cada dilución en tubos de 0.2 mL. Por cada muestra a analizar se preparó además un tubo de 0.2 mL con una referencia comercial del mismo sexo cromosómico

(Promega, Madison, WI, USA o Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), diluyendo 2.5 μL en 7.6 μL de buffer TE para tener la misma concentración que la muestra.

Se preparó una mezcla de digestión para 16 reacciones, se mezcló por pipeteo y luego se agregaron 2.9 μL de la mezcla de digestión a cada tubo con ADN para tener un volumen final de 13 μL . Se mezcló por pipeteo.

Condición final por tubo:

H ₂ O libre de nucleasas	1 μL
Buffer de restricción	1.3 μL
BSA	0.1 μL
Enzima Alu I	0.25 μL
Enzima Rsa I	0.25 μL
ADN	10.1 μL

Se llevaron los tubos al ciclador. Programa: 37°C 2 hs, 65°C 20', 4°C ∞ (tapa a 37°C porque a más de 65°C la enzima se desnaturaliza).

Se tomaron 2 μL del producto de digestión y se corrieron en un gel de agarosa 0.8% para determinar si la muestra se digirió completamente y además comprobar que la mayoría del producto digerido tenga entre 200 y 500 pb.

III.8.4 Marcado fluorescente de las muestras

De aquí en adelante se trabajó evitando la exposición a la luz de las muestras ya que los fluorocromos Cy3 y Cy5 son fotosensibles.

Se centrifugaron las muestras digeridas a 6000 $\times$ g 1', a cada muestra se le agregó 2.5 μL de *Random Primers* (Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit Agilent Technologies) y se llevaron los tubos al ciclador para la desnaturalización. Programa: (98°C 3', 4°C ∞)

Se prepararon 2 mezclas de marcación en hielo, una para las muestras con Cy5 y otra para las referencias con Cy3.

Finalizada la desnaturalización, se centrifugaron las muestras a 6000 $\times$ g 1' y se agregó la mezcla de marcación, pipeteando suavemente para homogeneizar.

Condición por tubo:

H ₂ O libre de nucleasas	2µL
Buffer de reacción 5x	5µL
dNTPs 10x	2.5µL
Cy3 dUTP/Cy5 dUTP	1.5µL
Polimerasa EXO(-) Klenow	0.5µL
Producto de digestión con random primers	13.5µL

Se llevaron los tubos al ciclador al programa (37°C 2 hs, 65°C 10', 4°C ∞).

Mientras se lleva a cabo la marcación, se rotularon tubos de 2 mL conteniendo una columna de purificación Agilent (16 tubos).

Finalizada la marcación, se centrifugaron las muestras a 6000×g 1'. Se agregaron 430 µL de TE (pH 8,0) a cada tubo de reacción y se pasaron a la columna correspondiente.

Las columnas ensambladas se centrifugaron a 14000×g 10' a temperatura ambiente. Se desarmó la columna del tubo para descartar el volumen eluido. Luego se volvió a ensamblar y se agregaron 480 µL de TE (pH 8.0) a cada columna. Se repitió el procedimiento 1 vez. Se invirtió la columna y se colocó en un nuevo tubo de 2 mL luego se centrifugó a 1000×g 1' a temperatura ambiente para recuperar el producto marcado purificado.

El volumen obtenido de cada muestra debe estar entre 20 y 32 µL. Se midió el volumen eluido para luego poder calcular las eficiencias de marcado.

Se tomaron 1.5 µL de la muestra marcada para medir en el Nanodrop la cantidad de ADN y la cantidad de marca para cada muestra (medición en Nanodrop en modo Microarray, dsDNA).

Se calculó el rendimiento y la actividad específica según las siguientes fórmulas:

Rendimiento (µg)=Volumen total * concentración/1000

Actividad específica = concentración de ADN marcado/ concentración de ADN

Aquellos productos con rendimiento entre 8 y 13 y actividad específica entre 20 y 60 se consideraron aptos para continuar el experimento.

Se centrifugaron las muestras en una centrifuga de vacío (Speed-Vac) a temperatura ambiente hasta llegar a 8 μ L (tiempo variable según la muestra).

Se mezcló cada muestra con su correspondiente referencia en tubos de 0.2 mL teniendo en cuenta que las actividades específicas sean similares/iguales y se llevó a volumen final de 16 μ L con TE (pH 8.0) en caso de que fuera necesario.

III.8.5 Hibridación

Se preparó la mezcla de hibridación de la siguiente manera:

Condición por tubo:

Cot-1 DNA (1.0mg/mL)	2 μ L
10x a CGH Blocking Agent	4.5 μ L
2x HI-RPM Hybridization Buffer	22.5 μ L
Muestra + referencia	16 μ L

Se mezclaron por pipeteo y luego se centrifugaron a 1000 $\times$ g durante 1'.

Luego se llevaron los tubos al ciclador. Programa:(98°C 3', 37°C 30') al finalizar el programa las muestras se centrifugan rápidamente a 1000 $\times$ g, 1'. Luego se volvieron a llevar al ciclador para mantener la temperatura a 37°C.

Se colocó el *backing* (vidrio con 8 gomas contenedoras en posiciones espejadas respecto del array que contiene los oligos) dentro de la cámara de hibridación (Agilent Sure Hyb chamber) abierta. Se sembraron en cada pocillo 40 μ L de la mezcla de hibridación de cada muestra, para luego colocar sobre este último el vidrio que contiene las sondas boca abajo de manera que quedan expuestas las sondas a las muestras sembradas.

Se colocó la tapa de la cámara de hibridación, se deslizó y ajustó la abrazadera aseguradora de la misma que permite mantener unidos los dos vidrios rápidamente para mantener la temperatura a 37°C. Rápidamente se comprueba que no haya burbujas fijas entre los dos

vidrios girando lentamente la cámara de hibridación que los contiene para comprobar que la mezcla llega a todas las sondas.

Se colocó la cámara de hibridación ensamblada en el rotor del horno previamente estabilizado a 67°C con una velocidad de rotación de 29 rpm (radio: 8 cm) durante 24 h; del lado opuesto del rotor se colocó una cámara de hibridación para balancear el rotor.

III.8.6 Lavado

Se colocó en un horno a 38°C toda la noche, una botella estéril con la solución de lavado 2 (Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2) así como el recipiente de lavado sumergido en agua Mili-Q tapado. Esta temperatura es un grado más a la descripta en el protocolo de Agilent y fue óptima para disminuir la hibridación inespecífica evitando de esta manera la generación de artificios (principalmente ganancias subteloméricas).

Al día siguiente de la hibridación se realizó el lavado. Los recipientes utilizados para lavar el vidrio hibridado fueron previamente lavados 5 veces con abundante agua Mili-Q para evitar rastros de marcación de ensayos anteriores. El lavado debe ser realizado en una zona donde no haya altos niveles de ozono (5 ppb o menos).

Se colocó la solución de lavado 1 (Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1) en un bowl y en un recipiente colocado sobre un agitador magnético a temperatura ambiente de forma tal que cubra por completo la altura del vidrio del array. También se colocó sobre un agitador magnético con temperatura de 38°C el recipiente que se dejó calentando toda la noche.

Cumplidas las 24 h de hibridación se procedió a sacar la cámara de hibridación y se comprobó que todas las burbujas siguieran moviéndose libremente dentro de cada compartimento. Para abrir la cámara de hibridación, se tomaron con cuidado los dos vidrios de manera tal que no se separen ni se filtre el contenido para separar los vidrios recién una vez sumergidos en el bowl con la solución 1 de lavado.

Inmediatamente luego de separarlos, se tomó el vidrio que contiene las sondas y se sumergió en el recipiente preparado con solución de lavado 1 durante 5' con agitación a 350 rpm (radio: 8 cm) aproximadamente (de forma que se mezcle, pero evitando que se formen burbujas que impidan el lavado) a temperatura ambiente. Pasados 4 minutos se preparó la solución de lavado 2 (precalentada durante la noche) en otro recipiente con agitación a 38°C. Cumplidos los 5' de lavado 1, se pasó la gradilla con el vidrio al recipiente preparado con solución de lavado 2

durante 1' con agitación a 350 rpm (radio: 8 cm) aproximadamente a 38°C. Cumplido el tiempo, se retiró muy lentamente la gradilla del recipiente de forma de evitar la formación de gotas sobre el vidrio.

III.8.7 Análisis

Se colocó el vidrio seco en el soporte para arrays para escanearlo inmediatamente en el escáner (Agilent SureScan #G2600D Microarray Scanner). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Agilent Cytogenomics software (v4.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

El algoritmo de detección usado fue el Z-score ADM-2. Se establecieron un mínimo de 3 oligonucleótidos consecutivos con la misma polaridad, que excedieran un umbral de la relación $\log_2$ absoluta de 0.35 para identificar una CNV. Las muestras cuya dispersión fue mayor al 0.3 (DLRSD>0.3) no fueron consideradas para el análisis. Los desbalances genómicos encontrados fueron anotados en el ensamble GRCh37/hg19 (Feb 2009).

Se evaluaron visualmente todos los desbalances y en los casos que fuese necesario se compararon de manera conjunta el comportamiento de los puntos de las regiones analizadas entre muestras con medidas similares de dispersión para determinar de manera conjunta el comportamiento de los puntos de las regiones con CNVs halladas no fueran artificios de la técnica.

Se generó una base de datos con los desbalances hallados para cada paciente. Se categorizaron las CNVs halladas siguiendo las guías del ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) para interpretación de variantes que tiene en cuenta el nivel de evidencia disponible dividiéndolas 5 categorías: patogénicas, probablemente patogénicas, variantes de significado incierto (VUS, por sus siglas en inglés *variant of uncertain significance*), probablemente benignas, y benignas [154].

Con este propósito se realizó una búsqueda de información en diferentes bases de datos para cada desbalance hallado. Las bases de datos consultadas fueron las siguientes: Database of Genomic Variants (DGV, <https://projects.tcag.ca/variation/>), DECIPHER (<https://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>), OMIM (<https://www.omim.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org/>) y ORPHANET (<https://www.orpha.net/>).

Además, se realizaron búsquedas bibliográficas en PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) para cada desbalance consignando, como palabras clave, la región cromosómica (banda, sub-banda), el tipo de anomalía, los genes involucrados y el fenotipo del paciente.

En algunos casos, y de estar disponibles, se analizaron muestras de familiares para la correcta interpretación de los hallazgos en el paciente.

Se consideraron como **clínicamente relevantes** aquellos desbalances que según los criterios de ACMG para interpretación de variantes resultaron **patogénicos, probablemente patogénicos**.

III.9 SECUENCIACIÓN MASIVA (SM)

Se seleccionó un subgrupo de pacientes con CC para su estudio mediante SM en paralelo (ver en algoritmo de análisis). En algunas muestras se realizó secuenciación exómica enviando una alícuota de ADN a la empresa MacroGen (Corea) para luego realizar un panel de genes *in silico*. Para otras, se seleccionaron muestras que presentaban fenotipos compatibles con genes incluidos en un panel comercial de CC y de miocardiopatías para ser estudiados mediante SM dirigida. en el laboratorio Novagen (CABA, Argentina)

III.9.1 SM Laboratorio húmedo

El procedimiento de las técnicas de secuenciación masiva incluye en términos generales:

1. Fragmentación del ADN: se generan pequeños fragmentos de distinto tamaño y posteriormente se unen a sus extremos unas moléculas llamadas adaptadores. El conjunto de todos los fragmentos de ADN unidos a sus adaptadores se conoce como biblioteca.
2. Enriquecimiento (opcional): consiste en seleccionar exclusivamente las áreas de interés antes de la secuenciación. Existen métodos de captura por hibridación en fase sólida y métodos de amplificación mediante PCR.
3. Hibridación del material seleccionado a una superficie sólida, para su posterior amplificación donde se llevará a cabo la reacción de secuenciación.
4. Secuenciación del material genético: la secuenciación y detección de las bases ocurren al mismo tiempo en todas las moléculas de ADN (secuenciación masiva y paralela).

Brevemente, se utilizaron alícuotas de 0,1 a 3 µg de ADN genómico de cada individuo. Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 para evaluar la concentración y pureza del ADN y un gel de agarosa para evaluar la integridad.

Para las muestras de ADN enviadas a la empresa Macrogen, el enriquecimiento de las secuencias en estudio se realiza por hibridación en solución a una mezcla de sondas complementarias a las regiones de interés (Kit Agilent SureSelect XT_V7_PostCap). Se solicitó una profundidad de lectura de 100X y un tamaño aproximado de lecturas de 100 pb.

Para las muestras de ADN enviadas al laboratorio Novagen, el enriquecimiento de las secuencias en estudio se realizó por hibridación en solución a una mezcla de sondas complementarias a las regiones de interés mediante un kit comercial (TruSight Cardio Illumina®) con una profundidad de lectura de 200X y un tamaño aproximado de lecturas de 150 pb.

III.9.2 SM Laboratorio seco

El análisis de los datos enviados por Macrogen se llevó adelante en colaboración con el equipo de bioinformáticos del Hospital Ricardo Gutiérrez quienes realizaron los análisis desde el archivo .fastq hasta el anotado de las variantes en el archivo .vcf.

El proceso comprende diversas etapas que fueron realizadas utilizando el protocolo/software recomendado por el *Broad Institute*, denominado *Genome Analysis Toolkit GATK* (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>). Brevemente, las lecturas en formato de archivos .fastq que provienen directamente de los equipos de secuenciación se sometieron a una serie de pasos de control de calidad, presencia de duplicados, lecturas incorrectas, etc, proceso que se realiza con paquetes bioinformáticos como el FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las secuencias con la calidad requerida se alinearon contra el genoma de referencia humano utilizando el ensamblado GRCh37/hg19. Las lecturas se ordenaron por coordenada con IGV-utilizando SortSam de Picard (<http://picard.sourceforge.net/>) para un fácil análisis visual. Se realizaron estadísticas del proceso de mapeo al archivo resultante (.bam) como profundidad media, % de lecturas alineadas, etc., utilizando SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>). Finalmente se obtuvieron lecturas alineadas al genoma de referencia que pasaron los filtros de calidad, donde se identificaron aquellos sitios en los cuales la muestra difiere del genoma de referencia mediante el llamado de variantes, cuyo resultado final es un archivo .vcf (*variant calling file*). En

este proceso se utiliza el Haplotype Caller de GATK (v.3.7) según lo sugerido por las prácticas establecidas por el *Broad Institute* (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>). En esta etapa el archivo .vcf sólo contiene para cada variante información asociada al proceso de llamado (posición genómica, tipo y naturaleza de la variante, profundidad de cada alelo, calidad, etc.). A continuación, se le asoció a cada una de las variantes información adicional proveniente de bases de datos biológicas como HapMap, 1000 genomas, LOVD, ClinVar, OMIM, gnomAD, dbSNP y Ensembl, entre otras, y predictores bioinformáticos en lo que se conoce como anotado de variantes. Esta parte del proceso se realizó con el programa VarAFT [155].

En el caso de los datos analizados en Novagen el proceso fue llevado a cabo por su equipo bioinformático hasta el anotado de las variantes en el archivo .vcf.

III.9.3 SM Priorización de variantes

Con las variantes anotadas se aplicó una selección bioinformática (panel *in silico*). Se seleccionaron los genes que se estiman se relacionan con la presencia de malformaciones cardíacas y/o es sabido que intervienen en la formación del corazón, síndromes que pueden presentar malformaciones o afecciones cardíacas y genes ortólogos asociados a cardiopatías en otras especies modelo (Lista de genes en Anexo IV) [26,107,127–130,132,156–158].

La priorización se realizó mediante el filtrado de los diferentes campos del archivo final .vcf. Para tal fin, se tuvo en cuenta el tipo de cambio que implica (sin sentido, sinónimo, inserciones, deleciones, etc), el modo de herencia (si se espera que sea recesiva, dominante, *de novo*), las frecuencias alélicas poblacionales (se incluyen variantes reportadas en bases de datos poblacionales con una frecuencia alélica menor -MAF, *minor allele frequency*- al 1%, si hubiera), la evidencia previa de asociaciones clínicas (se priorizan variantes reportadas en bases de datos de patologías como ClinVar, HGVS: Human Genome Variation Society, LOVD: Leiden Open Variation Database, UniProt), la información que brindan los predictores (DANN [159], FATHMM [160], MUTATION ASSESSOR[161], MUTATION TASTER [162], PROVEAN [163], FATHMM-MKL [164], SIFT [165], POLYPHEN [166]) sobre los posibles efectos estructurales sobre la proteína si lo hubiera, etc., con el fin de descartar aquellas variantes con alta probabilidad de ser neutras y focalizar los análisis en aquellas con mayor potencial patogénico. Toda la información en su conjunto se utiliza para establecer el posible efecto patogénico de cada variante sobre la proteína y en consecuencia, su relación con la patología, siguiendo los criterios establecidos por el *American College of Genetic and Genomics* (ACMG) en conjunto

con gupor de trabajo especializados del *Clinical Genome Resource* (ClinGen), para la estimación de la patogenicidad de variantes [167–170] en combinación con el sistema de puntos descripto por Tavgigian [171] con los cuales se clasificaron a las variantes en benignas, probablemente benignas, variantes de significado incierto (VUS), probablemente patogénicas, patogénicas. En forma similar a los descripto para el array-CGH, consideramos a las variantes clasificadas como probablemente patogénicas, patogénicas como variantes **clínicamente relevantes**. Esta información, se complementa con información de la literatura científica. La Nomenclatura se reporta según las recomendaciones del HGVS para la descripción de variantes de secuencia [172].

III.9.4. Validación de la/las variante/s clasificada/s como clínicamente relevante/s:

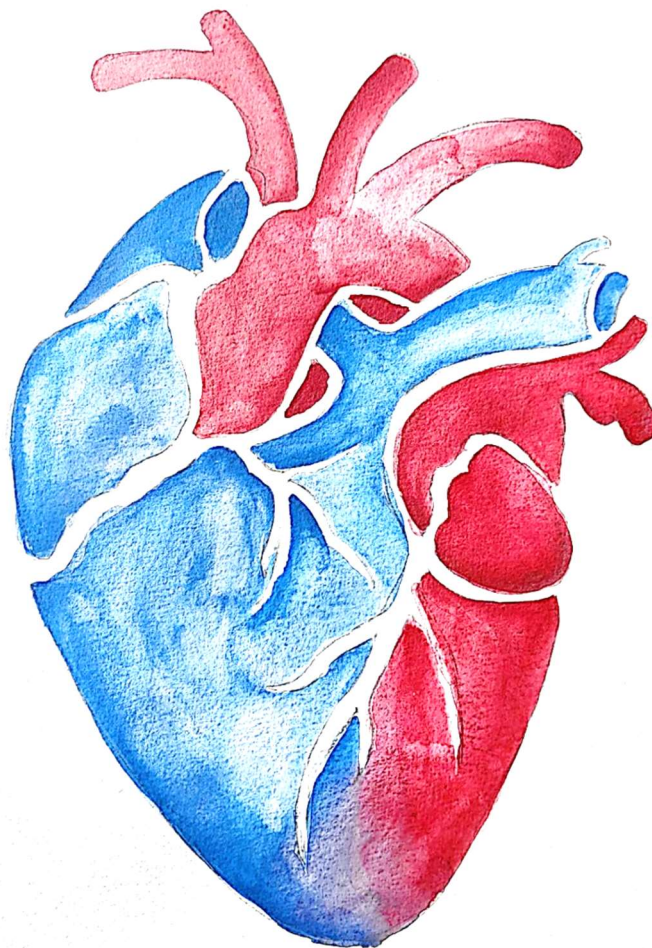
Una vez estimado el potencial patogénico de una variante, la misma fue confirmada por el método de secuenciación de Sanger, en forma similar a lo consignado anteriormente (ver tabla 3 donde figuran las regiones analizadas). De confirmarse la presencia de la variante, la misma fue analizada en los padres del afectado (de estar disponibles) a los efectos de estimar si se trata de una variante *de novo* o heredada.

III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para los pacientes del grupo A, se realizaron tablas de contingencia para determinar si existían diferencias significativas en la distribución de los sexos de la muestra y entre los pacientes que presentaron la Del22q11 en los diferentes grupos de cardiopatías estudiados. Se analizó también si la Del22q11 se distribuía en forma diferencial en las cardiopatías complejas o aisladas y entre aquellas que presentaban o no una anomalía mayor. Para el análisis de la presencia o no de la Del22q11 se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por la técnica de MLPA. El análisis estadístico se realizó mediante el test χ^2 o Fisher, según correspondiera, utilizando el software GraphPad 5.0

-CAPÍTULO IV-

RESULTADOS



En este capítulo presentaremos los resultados teniendo en cuenta cada uno de los grupos A y B estudiados

IV.1. GRUPO A

IV.1.1 (GRUPO A): Descripción del grupo de pacientes estudiados

Como se menciona en el apartado anterior, el Grupo A comprende pacientes que presentaban CC del tipo conotroncales exclusivamente.

La tabla 5 resume la distribución de las diferentes CCC entre los pacientes estudiados. Del total de pacientes, un 38.7 % presentó TDF, siendo esta CCC la más frecuente en la muestra analizada. De los 80 pacientes, 51 (63.8%) presentaban una cardiopatía simple (sin otra cardiopatía asociada ya sea conotroncal o septal), mientras que 29 (36.2%) presentaron una cardiopatía compleja. En la muestra analizada, 23 (28.8%) pacientes eran niñas y 57 (71.2%) varones. Se hallaron diferencias significativas en la distribución obtenida de niños y niñas respecto de la esperada ($p=0,0059$).

Tabla 5: Tipos de CCC especificando la distribución de sexos y si las mismas fueron simples o complejas.

CC	N	Genero		Simple	Compleja
		F	M		
TDF	31	11	20	30	1
TAP	6	2	4	3	3
TGV	19	5	14	9	10
IAA	11	3	8	6	5
AP + CIV	15	3	13	1	15
DSVD	2	1	1	0	2

N: cantidad de pacientes por grupo; CC: cardiopatía conotroncal; TDF: Tetralogía de Fallot; TAP: Tronco Arterioso Persistente; TGV: Trasposición de Grandes Vasos; IAA: Interrupción de Arco Aórtico; AP + CIV: Atresia Pulmonar con comunicación interventricular; DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho. Simple: no posee otra CC asociada, Compleja: posee otra CC conotrocal, septal u otra. El número total de CC es mayor a 80, porque en el caso de poseer más de dos cardiopatías conotroncales, el mismo paciente fue incluido en ambos grupos.

En la tabla 6 se resume la presencia de CC aisladas o con otra/s anomalía/s mayor/es o entre las diferentes CCC en los pacientes estudiados. Del total de pacientes, 59 (73.8%)

no presentaban otra anomalía mayor asociada. En el caso de aquellos que poseían otra anomalía mayor, 16 (20%) presentaron anomalías compatibles con el síndrome de Del22q11.

Tabla 6: Tipos de CCC aisladas o asociadas a una anomalía mayor (AM)

CCC	N	Con otra AM		Aislada
		Compatible con el síndrome de Del22q11	No compatible con el síndrome de Del22q11	
TDF	31	4	4	23
TAP	6	3	0	3
TGV	19	0	1	18
IAA	11	6	0	5
AP + CIV	16	5	1	10
DSVD	2	0	0	2

N: cantidad de pacientes por grupo; CCC: cardiopatía congénita conotruncal; TDF: Tetralogía de Fallot; TAP: Tronco Arterioso Persistente; TGV: Transposición de Grandes Vasos; IAA: Interrupción de Arco Aórtico; AP + CIV: Atresia Pulmonar con comunicación interventricular; DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho. El número total de CC es mayor a 80, porque en el caso de poseer más de dos CCC el mismo paciente fue incluido en ambos grupos.

IV.1.2 (GRUPO A) Estudios realizados para los pacientes con CCC

En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos para cada una de las técnicas empleadas y para cada centro participante. Como se observa, se resolvieron 60/80 cariotipos y un número similar de estudios de FISH. En los ensayos de MLPA, se analizaron 79 muestras con uno de los kits P250-B1 y 40 muestras fueron analizadas además con el kit P424-B2.

La eficiencia de resolución obtenida con la técnica de MLPA (kit P250-B2) fue mayor que las obtenidas por las otras técnicas. En todos los casos en que se analizaron las muestras tanto por FISH como por MLPA, los resultados de presencia o ausencia de la Del22q11, fueron concordantes.

Del total de pacientes, ninguno presentó una anomalía cromosómica, si bien existía sospecha de una posible delección en el cromosoma 22 en 3 de ellos. Asimismo, 16 pacientes (20.8%) presentaron una Del22q11 típica de 3 Mb, mientras que en 14 pacientes se observaron otras anomalías genómicas menos frecuentes (3 de los cuales poseían además la Del22q11).

Tabla 7: Resultados de los análisis realizados agrupados por lugar de derivación.

	Cariotipos			FISH			MLPA P250-B1				MLPA P424-B2		
Muestras	N	R	A	N	R	Del 22q11	N	R	Del 22q11	OA	N	R	A
Chaco	21	9	0	21	13	1	21	20	2	2*	16	16	1
La Plata	22	20	0**	22	21	6	22	22	6	3	6	5	0
Neuquén	13	12	0	12	7	3	12	11	4	5***	8	8	1
Salta	24	19	0	24	20	3	24	24	4	2	10	10	0
Total	80	60	0	79	61	13	79	77	16	12	40	39	2

N: cantidad de pacientes por grupo; R: resueltos; A: número de anomalías halladas; OA: otra anomalía (no Del22q11). *Uno de estos pacientes posee además la delección típica en 22q11. **En 3 de los pacientes existía sospecha de la delección 22q11 por citogenética. ***Dos de los pacientes poseen la delección típica en 22q11.

IV.1.3 (GRUPO A) Pacientes con CCC en quienes detectamos desbalances genómicos

En la tabla 8 se consignan los pacientes en los que se halló un desbalance. Debido a la dificultad de contactar a los familiares fue posible estudiar a los padres sólo para uno de los pacientes (N006). Los resultados de los análisis tanto por FISH como MLPA demostraron que ninguno de los padres eran portadores de la Del22q11. Sin embargo, mediante el estudio de MLPA la madre resultó portadora de la Del22q11.22 región D-E sonda TOP3B, que poseía el paciente junto con la Del22q11 de 3Mb.

La Figura 8 muestra, a modo de ejemplo, gráficos representativos del análisis realizado de los electroferogramas obtenidos con el kit P250-B2 en diferentes pacientes con el programa Coffalyser. Las delecciones se esquematizan como puntos rojos y las duplicaciones como puntos azules. La presencia de puntos alrededor de valores de 0.5 y 1.5 se corresponden a delecciones o duplicaciones heterocigotas, respectivamente. La cantidad de sondas involucradas en las delecciones y duplicaciones, estiman el tamaño de las mismas. Como se puede observar, uno de los pacientes poseía una delección heterocigota en 22q11.21 desde la sonda CLTCL1-3 hasta la LZTR1-16 (Figura 8A). Estos resultados son compatibles con la presencia de una delección típica de 3 Mb.

Tabla 8: Pacientes con CCC en los que se halló algún desbalance genómico.

Paciente	Fenotipo	Cariotipo	FISH	MLPA P250/P424
LP009	AP, CIV, agenesia de timo, dismorfias de pabellón auricular, nariz bulbosa.	46,XY*	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
LP011	AP, CIV, dismorfias auriculares	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
NE001	AP, CIV	46,XX	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
NE012	AP, CIV, parálisis unilateral del velo del paladar, hipotrofia de hemilengua izquierda.	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
SA010	AP, CIV, facie peculiar, hipoplasia renal izquierda	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
LP003	IAA, Facie peculiar, hipertelorismo, dismorfias auriculares, timo pequeño.	ND	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
LP004	IAA, hendiduras palpebrales cortas, epicanto, nariz bulbosa, orejas con helix en punta, aladas, fisura palatina, dedos largos, hernia umbilical, hipocalcemia, hipotiroidismo, retraso del neurodesarrollo	46,XY*	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
LP008	IAA, hendiduras palpebrales horizontalizadas, nariz con puente recto y corto, filtrum corto y marcado, glosptosis, retrognatia, dedos de manos finos y largos	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
LP020	TAP	46,XY*	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
CH018	TDF, pabellones auriculares displásicos, hendiduras palpebrales displásicas	ND	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
SA020	TDF	ND	ND	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
SA006	TDF, fisura palatina completa. facie peculiar	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
SA001	TDF, fisura palatina completa, facie peculiar	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1
CH001	TAP, pabellones auriculares displásicos	46,XY	ND	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1, 9q34(EHMT1)x3

Paciente	Fenotipo	Cariotipo	FISH	MLPA P250/P424
NE016	IAA, aorta bicúspide, CIV subaórtica, CIA	46,XX	ND	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1, 22q11.21(TOP3B)x3
NE006	COA, IAA, CIV	46,XY	Microdelección 22q 11.21	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1dn, 22q11.21(TOP3B)x1mat
LP014	AP, CIV	46,XY	NORMAL	rsa 22q11.21(TOP3B)x1
CH010	TDF, hendiduras palpebrales estrechas, nariz dorso ancho.	46,XX	NORMAL	rsa 17p13.3(GEMIN4-YWHAE)x1
SA014	TDF	46,XX	NORMAL	rsa 17p13.3(YWHAE)x1
SA018	AP, CIV, facie peculiar	ND	ND	rsa 22q11.21(LZTR1)x3
NE015	TDF	46,XX	ND	rsa 17p13.3(GEMIN4)x3
NE013	TDF, RM con hipotonía de tronco, facies peculiar, dismorfias	46,XX	ND	rsa 9q34.3(EHMT1)x3
LP002	TDF	46,XY	NORMAL	rsa 17p13.3(GEMIN4)x3
NE009	IAA	46,XY	ND	rsa 17p13.3(YWHAE)x3
LP018	TGV	46,XX	NORMAL	rsa 08p23.1(GATA4)x3
NE010	IAA, hipoplasia VI	ND	ND	rsa 1p36.33(TNFRSF4-5)x3
CH013	TDF, polidactilia postaxial	ND	ND	rsa 2q22.3(ACVR2A-11)x3

TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Trasposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP: Atresia Pulmonar, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho. CIV: Comunicación interventricular, COA: Coartación de aorta. * Sospecha de Del(22)(q11.2q12). ND: No determinado, RM: Retraso madurativo.

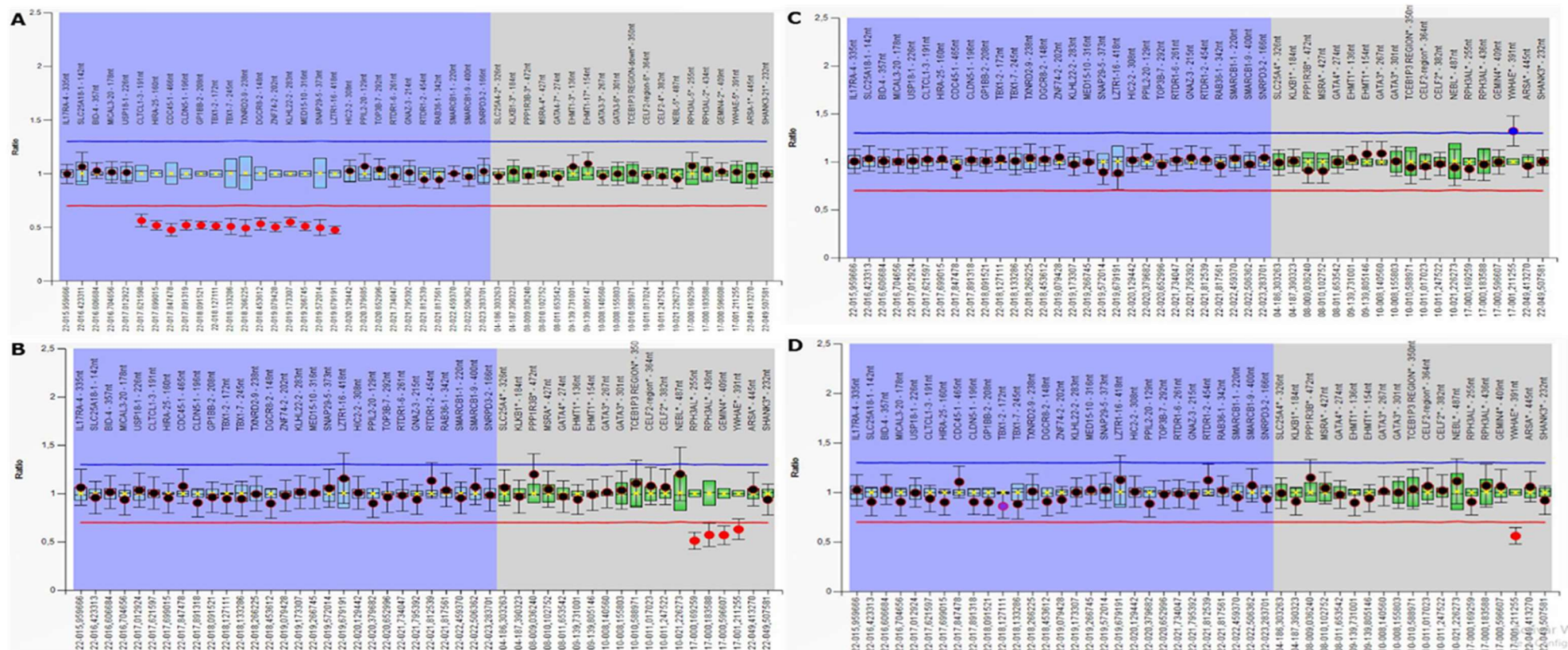


Figura 8: Gráficos representativos del análisis de los resultados de MLPA en diferentes muestras utilizando el kit P250-B2. Cada punto representa una sonda del kit. La región gris corresponde a sondas de regiones donde se observaron anomalías en pacientes que poseían CC y un fenotipo en algunos casos DiGeorge *like*. Las sombreadas en azul son las sondas repartidas a lo largo de toda la región 22q11 en estudio. Una delección se grafica con puntos rojos, mientras que una duplicación con puntos azules. **A:** Delección 22q11 típica de 3 Mb en heterocigosis, **B:** Delección en 17p13.3 2 loci *RPH3AL*, *GEMIN4*, *YWHAE* que comprende al menos 1MB (1041966pb) detectada en la muestra del paciente CH010. **C:** Duplicación en 17p13.3 locus *YWHAE* detectada en la muestra del paciente NE009. **D:** Delección o variante de secuencia en 17p13.3 en el locus *YWHAE* detectada en la muestra del paciente SA014.

En los pacientes CH001 y NE013 se detectó una duplicación en la región 9q34.3 en el locus *EHMT1* de una sola sonda. Esta región se encuentra en el kit p250 debido a que existe el síndrome de Kleefstra de herencia AD asociado a deleciones en 9q34.3 (OMIM:610253) cuya causa se asocia principalmente la haploinsuficiencia del gen *EHMT1*. En el caso del paciente CH001 se detectó también la Del22q11 que es la causa principal de su fenotipo. Debido a que sólo se evidencia una sonda en duplicación en esta región, se la clasificó como VUS. Sin embargo, el hecho de haber detectado esta duplicación en dos pacientes (de los cuales 1 tiene una Del22q11) y considerando que las variantes en 9q34.3 -a diferencia de la Del22q11- no son una causa frecuente de CC, es posible que se trate de una variante probablemente benigna de nuestra población.

En el paciente LP018 se detectó una duplicación que clasificamos como VUS ya que, si bien mapea en el gen *GATA4*, se encuentra en el extremo 3' no codificante (3'UTR). Las sondas en los *loci* más teloméricos del cromosoma 8 se encontraban en 2 dosis, por lo que esta duplicación debía ser intersticial y no se detectó por cariotipo. El gen *GATA4* está curado como haploinsuficiente pero no como triplosensible, pero al no saber sus puntos de corte ni la orientación de la región duplicada no es posible definir qué efecto tendría. No se describieron en esta posición variantes poblacionales en la base de datos de DGV. Lamentablemente la familia no se encontraba disponible para estudiar la segregación de la variante y por lo tanto no fue posible definir si era una variante *de novo* o heredada.

El paciente CH010 presentó una deleción en 17p13.3 loci *RPH3AL*, *GEMIN4*, *YWHAE* que comprende al menos 1Mb (1041966pb) (Figura 8B) que se clasificó como patogénica ya que contiene la región crítica del síndrome de microdeleción 17p13.3 distal (ORPHA:261257).

En otros casos se hallaron desbalances pequeños como la duplicación en 17p13.3, locus *YWHAE*, detectada en la muestra del paciente NE009 (Figura 8C) y una posible deleción (o variante de secuencia) en 17p13.3 en el mismo locus detectada en el paciente SA014 (Figura 8D). También detectamos dos duplicaciones en 17p13.3 en el locus *GEMIN4* en dos pacientes no relacionados. Estas 4 pequeñas CNVs se clasificaron como VUS y probablemente sean variantes benignas de nuestra población

Mediante el kit P424 se detectaron 2 duplicaciones de una sola sonda cada una. La primera, en el paciente NE010 en la región 1p36.33 locus *TNFRSF4*. Este locus se encuentra más telomérico respecto del otro locus interrogado en esta región, *GABRD*, y ambas sondas se

encuentran en el kit debido al síndrome de microduplicación/microdelección de 1p36 (OMIM: 607872). Sin embargo, en bases de datos de población general (dbDGV, gnomAD) se describieron CNVs en duplicación y delección en esta región más telomérica, por lo que la presencia de una sola sonda en la región determina que esta variante sea clasificada como VUS. La segunda duplicación detectada por este kit fue en el paciente CH013 en la región 2q22.3 locus *ACVR2A*. Esta región está relacionada con el síndrome de delección/duplicación 2q23.1 [173] y los genes más relevantes en esta región son *MBD5*, *ACVR2A*, *ORC4L*, *EPC2*, *KIF5C*, *MIR1978*, *LYPD6B* y *LYPD6*. Lamentablemente, el kit posee una única sonda, la de *ACVR2A*, por lo que no es posible determinar el tamaño de la región duplicada y por lo tanto la presencia o ausencia de otro/s de los genes relevantes. Por lo tanto, esta duplicación fue clasificada como VUS.

IV.1.4 (GRUPO A) Análisis de la presencia de desbalances genómicos en los pacientes con CCC

En la tabla 9 se resume la distribución de frecuencias de Del22q11 y otras anomalías para las diferentes CCC entre los pacientes estudiados utilizando ambos kits.

Tabla 9: Frecuencias de los diferentes desbalances hallados en los diferentes grupos de CCC.

Desbalance	Pacientes	TDF	TAP	TGV	IAA	AP + CIV	DSVD
N	77	29	6	19	10	16	2
Del22q11 (Frecuencia)	16 (0.21)	4 (0.14)	2 (0.33)	0 (0)	5 (0.50)	6 (0.38)	0 (0)
Del22q11 + otro desbalance (Frecuencia)	3 (0.04)	0 (0)	1 (0.17)	0 (0)	2 (0.20)	0 (0)	0 (0)
Otras anomalías (Frecuencia)	14 (0.18)	6 (0.21)	1 (0.17)	1 (0.05)	4 (0.40)	2 (0.13)	0 (0)
Otras anomalías aisladas (Frecuencia)	11 (0.14)	5 (0.17)	0 (0)	1 (0.05)	2 (0.20)	2 (0.13)	0 (0)
Anomalías en 17p (Frecuencia)	5 (0.06)	4 (0.14)	0 (0)	1 (0.05)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Se consideraron los resultados obtenidos en el MLPA. N: Cantidad de pacientes, TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Trasposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP + CIV: Atresia Pulmonar con comunicación interventricular, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho. Otras anomalías: todas aquellas anomalías halladas distintas de Del22q11. Otras anomalías aisladas: todas aquellas anomalías que

fueron encontradas en un paciente que no poseían Del22q11. El número total de CC es mayor a 77, porque en el caso de poseer más de dos CCC, el mismo paciente fue incluido en ambos grupos.

Se halló que el 50% de los pacientes con IAA poseían Del22q11, siendo éste el grupo que mostró diferencias significativas para la presencia de la delección ($p=0.02$). Los otros grupos de CCC que presentaron altas frecuencias fueron: AP + CIV (0.38) y TAP (0.33). La ausencia de la Del22q11 en los pacientes con TGV resultó estadísticamente significativa ($p=0.005$).

Para el grupo de pacientes con TDF, los desbalances en el cromosoma 17 fueron igual de frecuentes como las Del22q11. Asimismo, se hallaron otras anomalías genómicas en los pacientes con una frecuencia de 0.18. Los pacientes con IAA y TDF fueron los más prevalentes entre aquellos que presentaron otras anomalías diferentes a la Del22q11 (0.21 y 0.40 respectivamente)

Se analizó también la distribución de los desbalances considerando si los pacientes poseían una CCC simple o compleja (asociada a otra cardiopatía). La tabla 10 resume los resultados obtenidos para los diferentes tipos de CCC según sean simples o complejas.

Tabla 10: Desbalances genómicos hallados en los diferentes tipos de CCC simples o complejas

Kit 250-B2	TDF		TAP		TGV		IAA		AP + CIV		DSVD	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
N	28	1	3	3	9	10	5	5	1	15	0	2
Del22q11	3	1	2	0	0	0	3	2	0	6	0	0
Otras anomalías	5*	0	1	0	1	0	1**	2***	0	2	0	0
Kit 424	TDF		TAP		TGV		IAA		AP + CIV		DSVD	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
N	19	0	1	2	2	4	1	2	1	5	0	2
Anomalías	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

N: Cantidad de pacientes, TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Trasposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP + CIV: Atresia Pulmonar con comunicación interventricular, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho. S: Simple, C: compleja, *4 pacientes con desbalances en 17p. **Duplicación en 17p. *** Poseen también Del22q11.

En la Tabla 11 se detallan los resultados obtenidos para los diferentes tipos de CCC según si eran aisladas o con otras anomalías mayores. En caso de poseer otras anomalías mayores, se

consignó si las mismas estaban o no relacionadas al fenotipo esperado para el síndrome de Del22q11.

Tabla 11: Desbalances genómicos hallados para las diferentes cardiopatías conotruncales agrupadas según si presentaban o no otra anomalía mayor (AM)

	TDF			TAP			TGV			IAA			AP			DSVD		
	C/otra AM		A	C/otra AM		A	C/otra AM		A	C/otra AM		A	C/otra AM		A	C/otra AM		A
	A22q	NA		A22q	NA		A22q	NA		A22q	NA		A22q	NA		A22q	NA	
N	4	4	23	3	0	3	0	1	18	6	0	5	5	1	10	0	0	2
Del22q11	2/4	0/2	2/23	0/3	0/0	2/3	0/0	0/1	0/18	3/5	0/0	2/5	4/5	0/1	2/10	0/0	0/0	0/2
Otras anomalías (kit p250)	1/4	0/3	4/23 *	0/3	0/0	1/3 **	0/0	0/1	1/18	0/5	0/0	3/5 ***	0/4	0/1	2/10	0/0	0/0	0/2
Otras anomalías (Kit 424)	1/1	0/2	0/15	0/2	0/0	0/1	0/0	0/1	0/5	0/0	0/0	1/2	0/3	0/1	0/7	0/0	0/0	0/2

N: Cantidad de pacientes, TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Trasposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP: Atresia Pulmonar, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho, C/otra AM: con otra anomalía mayor, A22q: con una anomalía mayor asociada a 22q11, NA: con una anomalía mayor no asociada a 22q11, A: aislada (el paciente sólo poseía la cardiopatía). *Todos fueron desbalances en 17p. ** Posee además Del22q11. ***2 pacientes poseen además Del22q11.

Es interesante destacar que como se observa en la tabla 11, 8 niños de un total de 16 (50%) que presentaron la Del22q11, no poseían ninguna otra anomalía mayor más que la cardiopatía conotruncal.

No hallamos diferencias significativas cuando se analizó la distribución de la Del22q11 entre cardiopatías simples o complejas (Figura 9A). Observamos que la Del22q11 se encontraba con mayor frecuencia entre los pacientes que poseían otra anomalía mayor y que en todos los casos, las mismas eran compatibles con aquellas que se observan asociadas al síndrome velocardiofacial/síndrome de Di George ($p=0.011$) (Figura 9B)

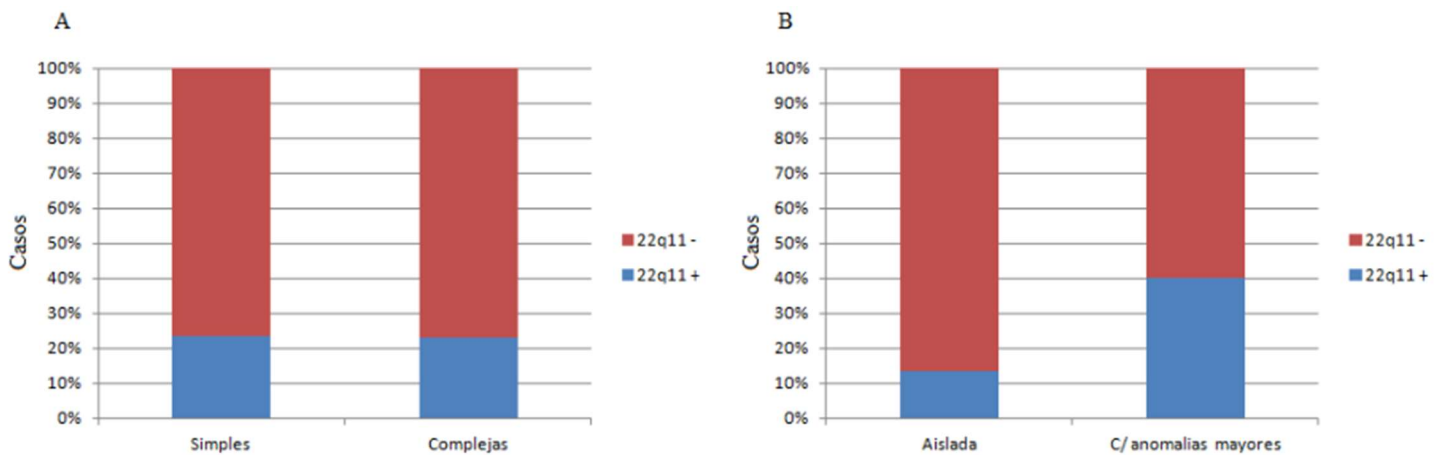


Figura 9: Distribución de la Del22q11 en cardiopatías simples o complejas (A) o bien en CC aisladas o con otra/s anomalía/s mayor/es (B). 22q11+: Niños con CCC que poseen la delección de 3Mb de la región 22q11. 22q11-; Niños con CCC que no poseen la delección en la región 22q11.

IV.1.5 (GRUPO A) Secuenciación del gen *NKX2-5*

Para esta parte del estudio se incluyeron todas aquellas muestras en las que no se detectó la presencia de microduplicaciones y/o microdeleciones genómicas que expliquen la patología (n=61)

Las variantes halladas mediante el análisis de la secuencia codificante del gen *NKX2-5* se presentan en la Tabla 12. Se hallaron 3 variantes novedales (Figura 10), 2 exónicas que codifican para cambios sinónimos y su posición no está evolutivamente conservada según los predictores utilizados. La tercera variante novel es intrónica y no modifica ni genera sitios de *splicing*. El resto de las variantes fueron reportadas previamente para la población general.

Tabla 12: Variantes halladas por secuenciación de Sanger del gen *NKX2-5* (NM_004387.4)

Variante	Localización	Análisis con predictores	ACMG	ClinVar	Cigotidad	N° de alelos en la cohorte	Frecuencia en la cohorte	Frecuencia Total gnomAD	Frecuencia latina gnomAD
c.-104G>C	5'UTR	1 benigno, 0 patogénicos	VUS (PM2, BP7)	-	HET	2	0.015625	0.0000325	0
c.63A>G	p.(Glu21=)	1 benigno, 0 patogénicos	B (BA1, BS2, BP7, BP6)	B	HOM/HET	68	0.53125	0.408	0.547
c.334+618G>A	Intrónica	8 benignos, 0 patogénicos	VUS (PM2, BP7)	-	HET	1	0.0078125	0	0
c.335-723G>T	Intrónica	1 benigno, 0 patogénicos	B (BA1, BS2, BP7)	-	HET	2	0.015625	0.0142	0.0142
c.335-682G>C	Intrónica	1 benigno, 0 patogénicos	B (BA1, BS2, BP7, BP6)	B	HOM/HET	28	0.21875	0.317	0.249
c.335-672G>A	Intrónica	1 benigno, 0 patogénicos	VUS (BP7)	-	HET	2	0.015625	0.000318	0
c.335-88G>A	Intrónica	1 benigno, 0 patogénicos	VUS (PM2, BP7)	-	HET	1	0.0078125	0.0000202	0.000119
c.450C>A	p.(Val150=)	1 patogénico, 0 benignos	VUS (PM2, BP7)	-	HET	2	0.015625	-	-
c.543G>A	p.(Gln181=)	1 patogénico, 0 benignos	B (BA1, BS2, BP7, BP6)	B	HET	4	0.03125	0.00748	0.00742
c.921G>T	p.(Gly307=)	1 patogénico, 0 benignos	VUS (PM2, BP7)	-	HET	1	0.0078125	-	-

VUS: Variante de significado incierto (*Variant of uncertain significance*), UTR: untranslated región: región no traducida. HOM: Homocigota, HET: heterocigota, PB posiblemente benigna, B: Benigna. =: simboliza cambio sinónimo. ACMG: Clasificación según el *American College of Medical Genetics*. En negrita variantes noveles.

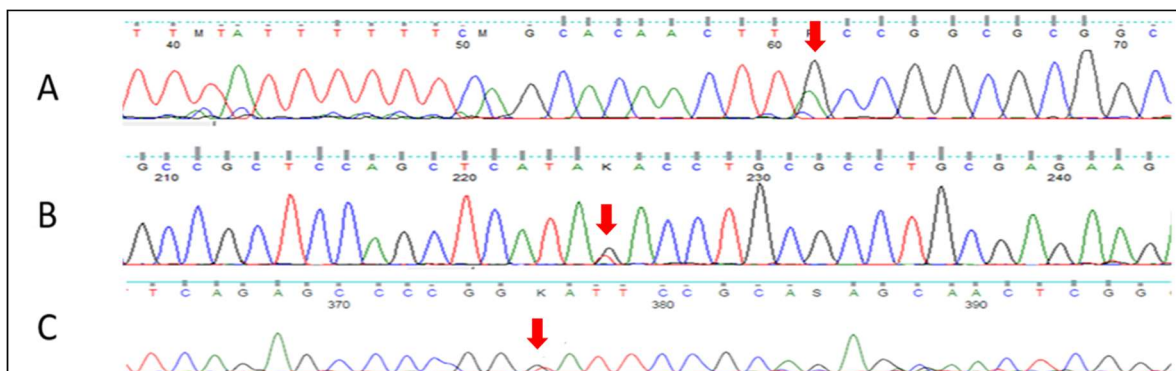


Figura 10: Electroferogramas representativos de los fragmentos en los que se detectaron **variantes noveles**. Las flechas señalan las variantes detectadas. **A:** fragmento directo con la variante NM_004387.4:c.334+618G>A. **B:** fragmento reverso con la variante NM_004387.4:c.450C>A. **C:** fragmento directo con la variante NM_004387.4:c.921G>T.

IV.1.6 (GRUPO A) Análisis del caso SA13

Uno de los pacientes ingresados al estudio presentaba como antecedente familiar un hermano con TDF (Figura 11), por lo que se decidió continuar estudiando esta familia en particular con otras técnicas.

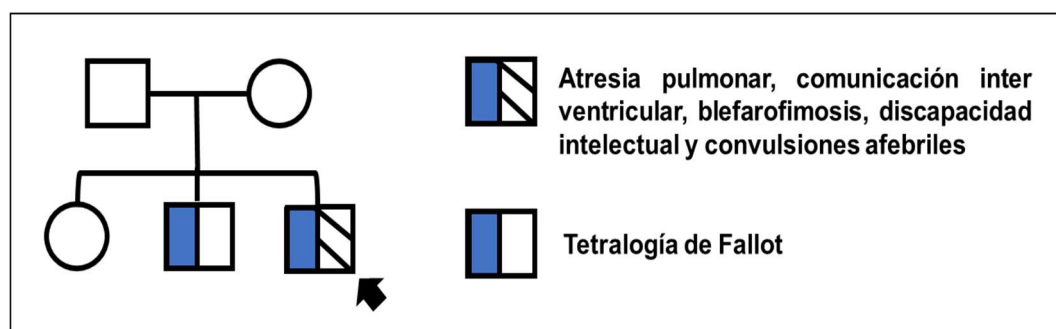


Figura 11: Genealogía del paciente SA13

Siguiendo las guías internacionales para análisis de pacientes con discapacidad intelectual, se realizó inicialmente un estudio de array-CGH. Se halló un pequeño desbalance de 167 kb arr[GRCh37] 16p13.3(6371455_6539321)x1 que comprende parcialmente al intrón 2 del gen *RBFOX1*. Esta variante está reportada en la base de datos de población general DGV y gnomAD. Por otro lado, se describieron CNVs que solapan en más del 80% con esta CNV clasificadas como VUS (4), probablemente benigna (1) y benigna (1) en las bases de datos de pacientes ClinVar y DECIPHER. Teniendo en cuenta estas observaciones y que el gen *RBFOX1* aún no se encuentra curado como haploinsuficiente, se clasificó la variante hallada como VUS.

No se hallaron otras CNVs de relevancia clínica en el paciente, por lo que se continuó analizando el caso mediante SM de exones con posterior análisis de un panel *in silico* de genes relacionados a CC. En la tabla 13 se observan las variantes de posible relevancia clínica seleccionadas.

Tabla 13: Variantes de (posible) relevancia clínica presentes en el paciente SA13

Gen	Transcripto	Cambio aminoacídico	Nucleótido	Frec	Predictores	ClinVar	Clasificación (criterios cumplidos)
MYH6	NM_002471.4	p.(Lys1759Arg)	c.5276A>G	0	Deletérea	-	VUS (PM2, PP3)
MYH7	NM_000257.4	p.(Glu867Lys)	c.2599G>A	<0.01	Deletérea	VUS	VUS (PM1, PM2, PP3)
VEGFA	NM_003376.6	p.(Glu35*)	c.103G>T	<0.01	N/A	-	Probablemente patogénica (PVS1, PM2)

Frec: frecuencia consultada en las siguientes bases de datos: gnomAD (Max), gnomAD (Aggregated), gnomAD (Genome), TOPMed Bravo, gnomAD (Exome), India DB, Mexican DB, ABraOM, Iranome, GME Variome, Turkish Variome, 4.7KJPN. Predictores: SIFT, POLYPHEN2, MUT TASTER, MUT ASSESSOR, FATHMM, dbSCSNV RF, dbSCSNV Ada, GERP, GenoCanyon, fitCons, MetaRNN. Clasificación: según los criterios de Richards 2015 y Tavtigian 2020 [167,179] y en particular para la variante en *MYH7* se tuvo en cuenta la adaptación a las guías específicas [169].

El gen *MYH6* codifica la subunidad de cadena pesada alfa de la miosina cardíaca que es un hexámero compuesto por dos subunidades de cadena pesada, dos subunidades de cadena ligera y dos subunidades reguladoras. Las variantes en este gen causan miocardiopatía hipertrófica familiar y CIA (OMIM:160710) y también se reportaron variantes en pacientes con CIV [174]. La variante de cambio de sentido *MYH6*: c.5276A>G codifica un cambio de una lisina por una arginina en la posición 1759 p.(Lys1759Arg); el puntaje acumulado de los predictores la clasifica como deletérea (0.707).

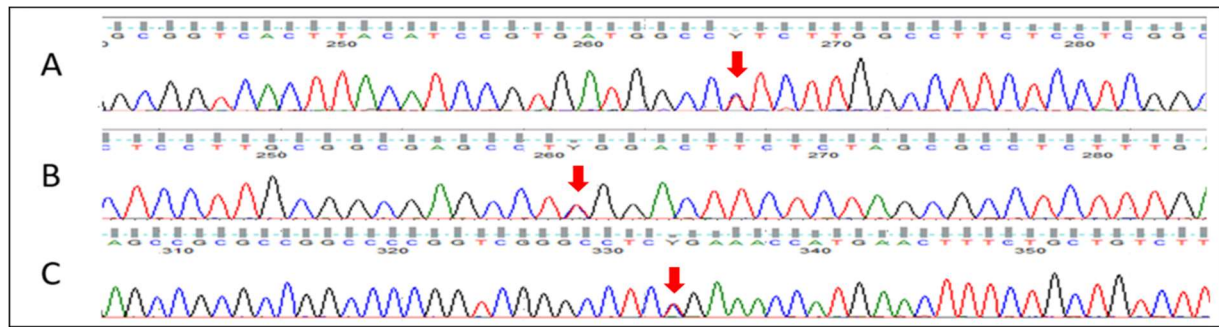
El gen *MYH7* codifica la subunidad beta (o lenta) de cadena pesada de la miosina cardíaca. Se expresa predominantemente en el ventrículo humano normal. También se expresa en tejidos musculares esqueléticos ricos en fibras musculares de tipo I de contracción lenta. Los cambios en la abundancia relativa de esta proteína y la subunidad alfa (o rápida) de la miosina cardíaca se correlacionan con la velocidad de contracción del músculo cardíaco. Variantes patogénicas en este gen están asociadas con miocardiopatía hipertrófica, dilatada, ventrículo izquierdo no compactado, miopatía de almacenamiento de miosina, miocardiopatía dilatada y miopatía distal de Laing (OMIM:*160760). También se describieron en pacientes con defectos septales y anomalía de Ebstein sugiriendo un amplio espectro fenotípico [175]. La variante c.2599G>A codifica un cambio de sentido no conservativo de una ácido glutámico por una lisina en la posición 867 p.(Glu867Lys); el puntaje acumulado de los predictores la clasifica como deletérea (0.897). La variante se encuentra reportada 5 veces en ClinVar como VUS y con 4 fenotipos asociados: miocardiopatía, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y fenotipo cardiovascular. Esta variante se encuentra también reportada en

bases de datos de población general, pero su frecuencia es menor a 0.064%, que es la frecuencia de la variante patogénica más frecuente reportada en *MYH7* (NM_000257.4:c.3158G>A). Para el gen *MYH7* existe una adaptación de los criterios de clasificación de variantes del ACMG. Teniendo en cuenta estos criterios particulares, esta variante que sería probablemente patogénica según los criterios estándares, se reclasifica como VUS por no poder usar el criterio PP2. Sin embargo, se la podría considerar en este caso particular como de posible relevancia clínica para el paciente ya que de confirmarse que sea *de novo* se reclasificaría a probablemente patogénica [169].

El gen *VEGFA* codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular A, miembro de la familia de factores de crecimiento PDGF/VEGF, una proteína que se une a la heparina y existe como un homodímero unido por puentes disulfuro. Este factor de crecimiento induce la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares y es esencial para la angiogénesis (OMIM:192240). La variante c.103G>T codifica para un codón de terminación prematuro que conduciría a una proteína trunca no funcional o a la degradación de su ARNm por NMD (*nonsense mediated decay*). Si bien se relacionó a la alteración de *VEGFA* con el desarrollo cardíaco y particularmente con pacientes con TDF [176,177], recientemente se reportaron variantes compatibles con la haploinsuficiencia de factores en la vía de VEGF en pacientes que presentaron TDF. Particularmente, una de ellas se trata de un codón de terminación prematuro situado 4 aminoácidos después del hallado en el paciente de nuestra cohorte (en p.39) en un paciente con un fenotipo sindrómico con TDF, válvula pulmonar bicúspide; baja talla, obesidad; dificultades de aprendizaje; depresión y/o ansiedad [175,178].

Las variantes halladas fueron confirmadas por secuenciación de Sanger (Figura 12) y estudiadas en el hermano afectado (Figura 13). Ninguna de las variantes clínicamente relevantes fue hallada en el hermano afectado y lamentablemente los padres no pudieron ser recontactados, por lo que no fue posible determinar si alguna o todas las variantes eran *de novo*.

Figura 12: Electroferogramas representativos de la secuenciación de Sanger en el individuo SA013 para los genes *MYH6* (reverso complementario), *MYH7* y *VEGFA* (reverso



complementario). Las flechas indican la presencia de las variantes halladas por SM en heterocigosis: A. MYH6:c.5276A>G , B. MYH7:c.2599G>A, C. VEGFA:c.103G>T.

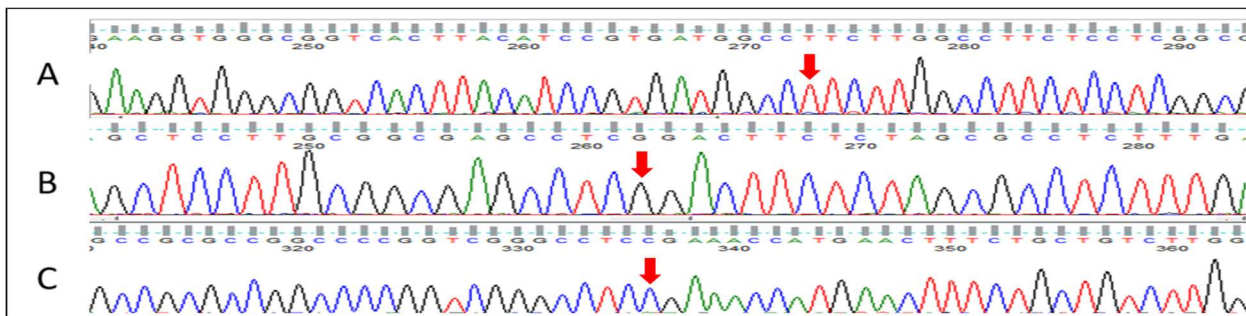


Figura 13: Electroferogramas representativos de la secuenciación de Sanger en el hermano de SA013. Las flechas indican la ubicación de las variantes halladas en el hermano afectado (Figura 12) y ausentes en este paciente. **A:** secuencia reversa complementaria MYH6:c.5276A. **B:** MYH7:c.2599G. **C:** secuencia reversa complementaria VEGFA:c. 103G>T

IV.2. GRUPO B

IV.2.1 (GRUPO B) Tipos de Cardiopatías estudiadas/ Análisis del universo muestral/ Descripción del grupo de pacientes estudiados

Para esta parte del trabajo, se reclutaron 254 pacientes que presentaban ACM o CC aisladas (CCA). La Tabla 14 resume la distribución de las diferentes CC entre los pacientes estudiados. Del total de 254 pacientes, un 37% (94/254) presentó CIV, siendo la CC más frecuente entre los pacientes. A su vez 107 presentaban una cardiopatía simple (sin otra cardiopatía asociada), mientras que 147 presentaron una cardiopatía compleja (Tabla 15). En la muestra analizada, 123 pacientes eran niñas y 131 eran varones (Tabla 15).

Tabla 14: Tipo de cardiopatía congénita especificando la distribución de sexos y si las mismas fueron simples o complejas.

Tipo de cardiopatía congénita	N	Sexo		Simple	Compleja
		F	M		
CIV	94	43	51	18	76
AP	33	18	15	4	29
COA	32	6	26	13	19
TGV	31	13	18	11	20
CIA	31	8	23	7	24
TDF	27	12	15	26	1
EP	19	9	10	4	15
DAP	16	7	9	4	12
AP + CIV	15	9	6	8	7
SCIH	15	7	8	9	6
DSVD	12	2	10	1	11
Ventrículo único	12	5	7	9	3
IAA	9	5	4	3	6
Ventrículo derecho hipoplásico	9	7	2	0	9
Dextrocardia	9	6	3	0	9
Canal auriculoventricular	8	2	6	1	7
Atresia tricúspidea	8	6	2	1	7
TAP	7	5	2	5	2
Anomalía de Ebstein	7	3	4	3	4
Anomalía Total de Retorno Venoso	7	4	3	5	2
Válvula aortica bicúspide	6	4	2	3	3
Ventrículo izquierdo hipoplásico	4	2	2	1	3
Anillo vascular	4	3	1	3	1
Estenosis tricuspidea	3	1	2	0	3
Insuficiencia mitral	3	1	2	0	3
Atresia mitral	3	1	2	0	3
Estenosis aortica	3	0	3	2	1
Atresia aortica	3	1	2	0	3
Miocardopatía no compactada	3	2	1	3	0
Hipoplasia del arco aórtico	2	1	1	0	2
Aorta hipoplásica	2	1	1	0	2
Ramas pulmonares hipoplásicas	2	2	0	0	2
Hipertrofia de cavidades izquierdas	2	0	2	0	2

Tipo de cardiopatía congénita	N	Sexo		Simple	Compleja
		F	M		
Ventrículo derecho hipertrófico	2	1	1	0	2
Dilatación de cavidades izquierdas	2	2	0	0	2
Agenesia de válvula pulmonar	2	1	1	1	1
Insuficiencia tricuspídea	2	0	2	0	2
Estenosis mitral	2	1	1	1	1
Estenosis venosa pulmonar	2	1	1	0	2
Miocardopatía hipertrófica	2	1	1	2	0
Tumor intracardiaco	2	1	1	1	1
Aurícula única	1	0	1	0	1
Fístula coronaria izquierda en arteria pulmonar	1	1	0	0	1
Atresia mitroaortica	1	0	1	0	1
Válvula Aortica hipoplásica	1	1	0	0	1
Prolapso Mitral	1	0	1	0	1
Prolapso tricúspide	1	0	1	0	1
Anillo valvula pulmonar y aortica	1	1	0	0	1
Anomalía parcial del retorno venoso	1	0	1	0	1
Miocardopatía dilatada	1	0	1	0	1
Malformaciones arteriales colaterales aorto-pulmonares	1	0	1	0	1
Bloqueo AV	1	1	0	0	1

N: Número de pacientes, CIV: comunicación interventricular, AP: Atresia pulmonar, COA: coartación de Aorta, TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Transposición de Grandes Vasos, EP: Estenosis pulmonar, AP+CIV: Atresia Pulmonar con comunicación interventricular, SCHI: síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho, IAA: Interrupción de Arco Aórtico. Simple: No posee otra CC asociada. Compleja: Posee otra CC conotroncal, septal u otra. Nota: el número total de CC es mayor a 254 porque en el caso de poseer más de dos CC, el mismo paciente fue incluido en ambos grupos.

Tabla 15: pacientes según el grupo de análisis especificando la distribución de sexos y si las mismas fueron simples o complejas

Pacientes	N	Sexo		Simple	Compleja
		F	M		
Con CCC	102	46	56	20	82
Con CC no conotruncal y sospecha de SDG	25	14	11	13	12
Con CC no conotruncal sin sospecha de SDG	127	63	64	74	53
Total	254	123	131	107	147

F: Femenino, M: Masculino, CC: Cardiopatía congénita, CCC:CC conotruncal, SDG: síndrome de DiGeorge.

En la tabla 16 se resume la distribución de los pacientes estudiados con CC y si poseían o no otra/s anomalía/s mayor/es. Del total de pacientes, 191 (75.2%) no presentaban otra anomalía mayor asociada. Por su parte, 63 (24.8%) pacientes poseían otra anomalía mayor y entre estos, 59 presentaban anomalías compatibles con el síndrome de Del22q11 (SDG).

Tabla 16: Pacientes con CC aisladas o asociadas a una anomalía mayor (AM).

Pacientes	N	Con otra AM		Aislada
		Asociadas a 22q11	No asociadas a 22q11	
Con CCC	102	25	-	77
Con CC no conotruncal y sospecha SDG	25	5	4	16
CC no conotruncal sin sospecha SDG	127	29	-	98
Total	254	59	4	191

CCC:Cardiopatía congénita conotruncal. CC: Cardiopatía congénita. AM: anomalía mayor. SDG Síndrome de DiGeorge.

IV.2.2 (GRUPO B) Estudios realizados para los pacientes

El análisis de las muestras se realizó siguiendo el algoritmo propuesto en la Figura 7, en donde se consigna el estudio realizado acorde al fenotipo que presentaba el paciente. En algunos pacientes seleccionados, sin embargo, fue necesario hacer pequeños cambios en el algoritmo propuesto debido a circunstancias particulares como ser requerimiento de nueva muestra, fallecimiento del paciente o insuficiente calidad de la muestra de ADN, entre otras.

De los 254 pacientes ingresados (63 ACM y 191 CCA) la posible etiología genética se evaluó en 159 pacientes analizados por al menos una técnica (Figura 14), mientras que el resto no pudo ser estudiado por diferentes factores como, por ejemplo, la falta de disponibilidad o la calidad insuficiente de las muestras.

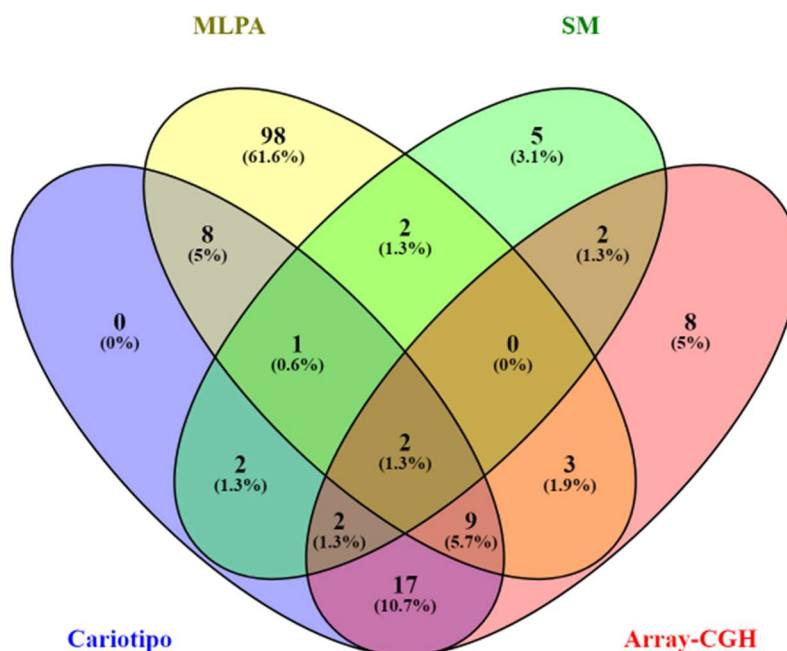


Figura 14: Diagrama de Venn del número de muestras que fueron posibles de ser analizadas mediante diferentes técnicas. MLPA: *Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*; SM: secuenciación masiva; Array-CGH: *Array Comparative Genome Hybridization*.

En conjunto, el algoritmo aplicado permitió hallar la contribución genética de las CC en 43 de estos 159 pacientes (27%). De un total de 123 pacientes en los que se realizó el estudio de MLPA, la causa de la afección se halló en 26 pacientes (21.1%). Entre los 43 pacientes estudiados por array-CGH, 9 (20.9%) presentaron CNVs clínicamente relevantes y entre los 16 pacientes estudiados por secuenciación masiva, en 10 (62%) se observaron variantes de significancia clínica. En las secciones siguientes se detallan los resultados obtenidos para este grupo de pacientes.

IV.2.2.1 (GRUPO B) Análisis de la presencia de anomalías genómicas en los pacientes mediante la técnica de MLPA

De los 127 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión para ser estudiados por MLPA, se analizaron 123 muestras con el kit P250-B2. La presencia de deleciones y duplicaciones

estudiadas mediante esta técnica fueron analizadas, al igual que en grupo A, con el software Coffalyser.

En la tabla 17 se consignan los pacientes en los que se halló un desbalance por MLPA. Debido a que en algunos casos fue difícil contactar a los familiares y en otros casos los familiares no consintieron ser estudiados, fue posible estudiar sólo a otros miembros en 9 de las 25 familias afectadas. La delección típica fue detectada en 2 madres (PID 89M y PID 219M) así como también en 2 de los 3 hermanos de PID 89.

En la Figura 15 se muestran gráficos representativos de algunos de los desbalances hallados en este grupo de pacientes con el kit P250-B2. La Figura 15A muestra el resultado hallado en un paciente que poseía una duplicación heterocigota en 22q11.21 desde la sonda CLTCL1-3 hasta la sonda LZTR1. Otro de los pacientes (Figura 15B) poseía una delección heterocigota en 22q11.21 desde la sonda CLTCL1-3 hasta la sonda DGCR8, resultados que son compatibles con la presencia de una delección corta de aproximadamente 1.5 Mb.

En el paciente PID 126 se observó una sola dosis en el exón 7 del gen *TBX1* (Figura 15C). Este resultado es compatible con dos posibles situaciones: la ausencia de la región en sí misma, o bien la presencia de una variante puntual que impida la hibridación y posterior ligación de las hemisondas. Para averiguar la causa del resultado obtenido, se realizó la secuenciación del exón 7 del gen *TBX1* en este paciente. El análisis de la secuencia determinó que toda la región exónica que incluye la región en la que hibridan las hemisondas (entre la A 520 y la A 566, Figura 16) se encontraba en aparente homocigosis. Esta prueba en conjunto con el análisis de la dosis de la región del MLPA (rsa 22q11.2 (*TBX1*-7)x1) es compatible con la presencia de una delección que incluiría al menos al exón 7 del gen *TBX1*. Teniendo en cuenta que la sonda que hibrida en el primer exón se encontraba en doble dosis y la siguiente sonda en doble dosis se encontraba en el exon 9 del gen *TXNRD2*, los puntos de corte estarían, entre el intrón 1 y el intrón 6 de *TBX1* y entre el intrón 7 de *TBX1* y el intrón 8 del gen *TXNRD2*. Esta delección produciría una proteína trunca o bien la degradación del mensajero de *TBX1*. Se intentó realizar un análisis de array-CGH, pero la calidad del ADN no era suficientemente buena y no se logró contactar a la familia para la toma de una nueva muestra.

Tabla 17 Pacientes en los que se halló algún desbalance por MLPA.

PID	Género	Fenotipo	MLPA	Familiares analizados
21	M	AP, CIV, MACAPs	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
55	M	IAA tipo B, CIV Subaortica, facie peculiar, baja implantación de pabellones auriculares, dedos de manos y pies delgados sobrepuestos largos, Esternón corto, ventriculomegalia, 3° ventrículo discretamente dilatado. Hepatomegalia.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
69	F	Canal AV, TAP, válvula única y pequeña, disfunción severa del VD, Edema bipalpebral con escasa apertura de ojos, orejas rotadas, comisuras bucales hacia abajo, pliegues palmares anómalos, tórax en escudo, cuello corto.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
89	F	AP, CIV, arco aórtico derecho, ramas pulmonares hipoplásicas, FLAP	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M, H1 y H3: rsa 22q11.2 (CLTCL1-LZTR1)x1 H2: rsa(P0250)x2
119	M	TDF, Hipocalcemia	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
126	F	TGV, CIV	rsa 22q11.2(TBX1-7)x1	-
158	F	Estenosis de ramas pulmonares	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
160	F	EP, CIV, CIA, DAP, dismorfias faciales, retraso madurativo.	rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x1	-
165	F	TAP, dismorfias faciales, proptosis ocular, ausencia de cejas, microstomia, retrognatia, pulgares largos.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M y P: rsa(P0250)x2
171	F	IAA, pie bot y dismorfias faciales	rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x1	M y P: rsa(P0250)x2
182	M	TDF, dismorfias faciales	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M y P: rsa(P0250)x2
183	F	AP, CIV, hendiduras palpebrales cortas, nariz bulbosa, microstomia, dedos y ortejos largos y finos.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	
191	F	TDF	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M y P: rsa(P0250)x2
193	F	TDF, ausencia de timo	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M y P: rsa(P0250)x2
205	F	Anillo Vascular, orejas pequeñas, capuchón palpebral, puente nasal con rodete, dedos largos.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	

PID	Género	Fenotipo	MLPA	Familiares analizados
219	F	CIV, dilatación de cavidades izquierda, dismorfias, capuchón periorbitario, nariz bulbosa con rodete nasal, retromicrognatia, paladar completo, úvula no evaluable, orejas muy pequeñas, bajas y rotadas, mamilas umbilicadas e hipertelóricas, dedos largos.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M: rsa 22q11.2 (CLTCL1-LZTR1)x1
267	F	AP, CIA, CIV, levocardia, RCIU, Faciales ligera asimetría intra helix (izquierdo replegado), angioma plano en párpados glabella (sona derecha). Hipoplasia ungueal de los 5to dedos y ortijos bilaterales, fosita pilonidal con fondo, impresiona ano anterior, labios menores hipoplásicos.	rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x3	-
281	M	AP, CIV, agenesia de timo.	rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x1	M y P: rsa(P0250)x2
294	F	AP, CIV, nariz bulbosa, fosita pilonidal sin fondo, dedos largos.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
332	F	TAP, monoreno, fisura de paladar blando.	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
343	F	TDF	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
348	M	TDF	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	M y P: rsa(P0250)x2
364	M	IAA, facies compatibles con SDG	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
367	M	TDF, hipocalcemia, convulsiones, facies compatibles con SDG	rsa 22q11.2(CLTCL1-LZTR1)x1	-
375	F	IAA	rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x3	-
380	M	Canal AV, TDF, cuerpo calloso adelgazado, impresiona 12 costillas izquierdas con fusión de 7ma y 8va a nivel distal, costillas finas, cejas pobladas, orejas de implantación baja displásicas con helix plegado con rotación posterior, hipotelorismo, nariz de dorso largo y base angosta, narinas antevertidas boca pequeña, paladar alto cuello corto, pterigium, fontanela anterior permeable con diastasis de suturas, braquicefalia, hirsutismo generalizado, no se identifican mamilas. Clinodactilia del 5to dedo, sindactilia, campodactilia, ano posterior, no se palpan testículos en bolsa.	rsa 18p11.32(P070-B3)x3,18q23(P070-B3)x3*	-

CCA: Cardiopatía congénita aislada, ACM: Anomalía congénita múltiple; MACAPs: colaterales aorto-pulmonares grandes; TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Transposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP: Atresia Pulmonar, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho. CIV: Comunicación interventricular, COA: Coartación de aorta. FLAP: fisura labio-alveolo palatina, Canal AV: Canal auriculoventricular, SDG: Síndrome de DiGeorge. M: madre, P: padre; H: Hermana.

*Analizado con el kit P070-B3.

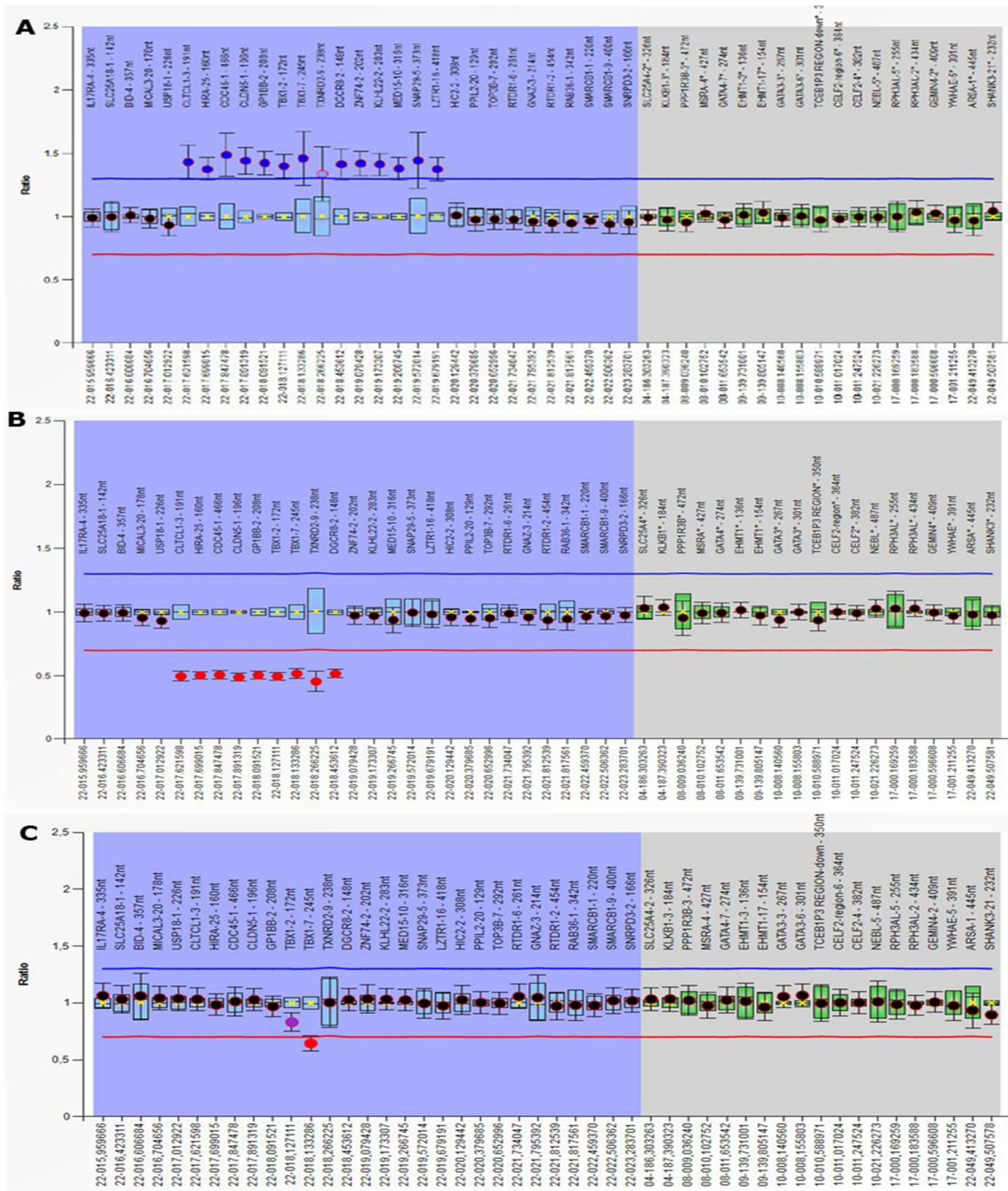


Figura 15: Gráficos representativos del análisis de los resultados de MLPA en diferentes muestras utilizando el kit P250-B2. Cada punto representa una sonda del kit. La región grisada corresponden a sondas de regiones donde se observaron anomalías en pacientes que poseían CC y/o un fenotipo de SDG-like y las sombreadas en azul a las sondas repartidas a lo largo de toda la región 22q11 en estudio. Una delección se grafica con puntos rojos, mientras que una duplicación, con puntos azules. **A:** Duplicación en 22q11 en heterocigosis. **B:** Delección corta en heterocigosis en 22q11.21. **C:** Delección o variante de secuencia en heterocigosis en la región 22q11.21 detectada con la sonda *TBX1-7*.

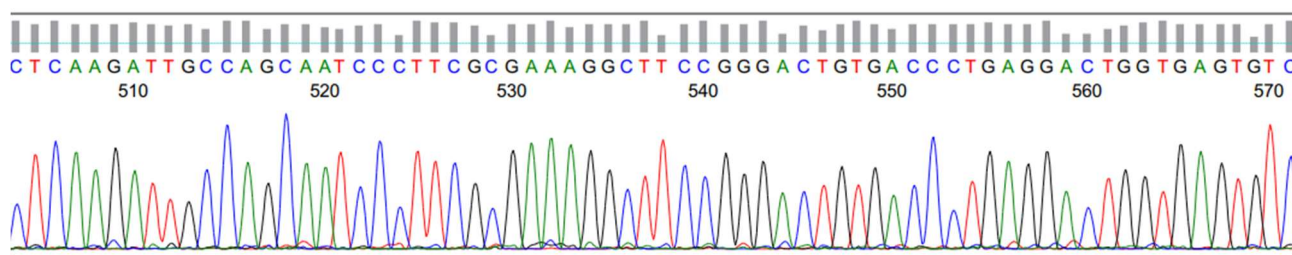


Figura 16: Electroferograma de la secuenciación del exón 7 del gen *TBX1* del paciente PID 126. Se muestra el resultado de la secuenciación del fragmento amplificado por PCR de la región del exón 7 del gen *TBX1* en la que se halló una sola dosis con una de las sondas del MLPA.

Por su parte, el paciente PID 380 ingresó con sospecha de trisomía 18 y un estudio de cariotipo que fracasó. La muestra de ADN fue de calidad insuficiente para el análisis de array-CGH y tampoco fue posible obtener una nueva muestra ya que el bebé falleció. Se optó, entonces, por analizar la muestra por MLPA con el kit P070-B2 que contiene las sondas en CTDP1-21 y THOC1-9 que interrogan 0.5 Mb del telómero del brazo largo y 0.2 Mb del telómero del brazo corto del cromosoma 18, respectivamente. Los resultados mostraron que ambas sondas estaban en 3 dosis (rsa 18p11.32(P070-B3)x3,18q23(P070-B3)x3, Figura 17). Este resultado es compatible con la sospecha de trisomía 18.

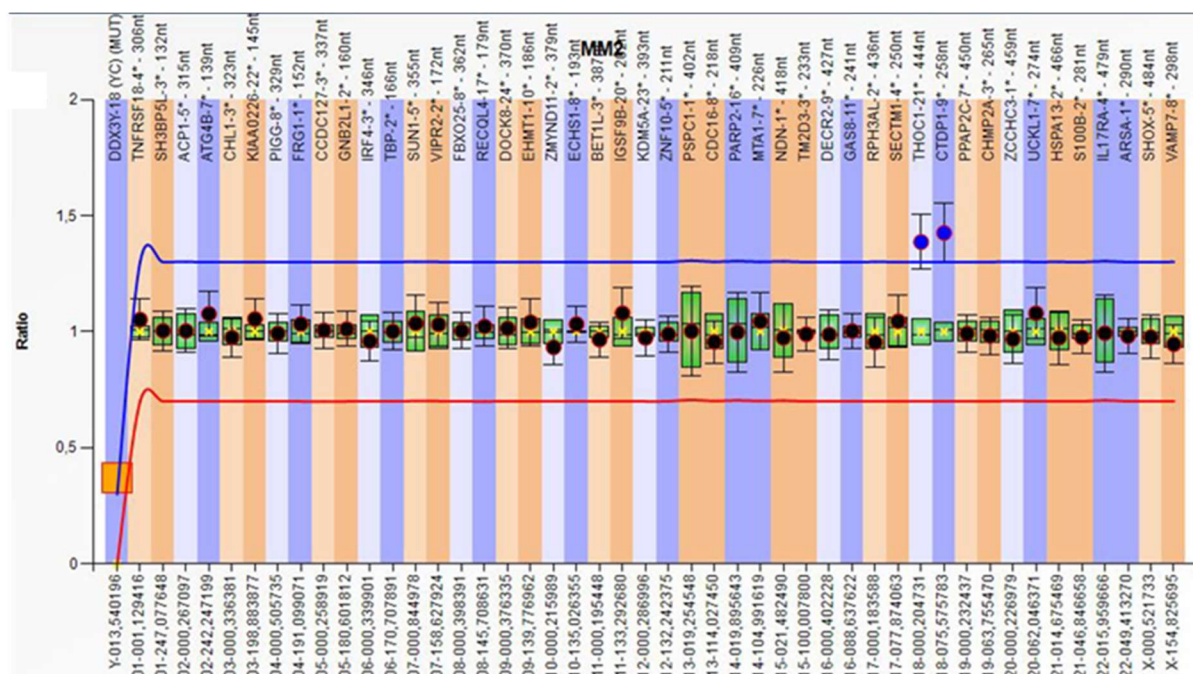


Figura 17: Gráficos representativos del análisis de los resultados de MLPA utilizando el kit P070-B2 para el paciente PID380. Cada punto representa una sonda del kit, que posee 2 sondas para cada cromosoma. Una delección se grafica con puntos rojos, mientras que una duplicación, con puntos azules.

En la Tabla 18 se resume el análisis de los resultados de los estudios de MLPA de acuerdo al tipo de CC y a si presentaban o no otra anomalía mayor. Se halló que 25 pacientes (20.32%) presentaron al menos un desbalance: 21/99 (21.21%) con CCC y 4/24 (16.66%) en el grupo de pacientes ingresados por presentar un fenotipo compatible con el SDG. Del total de 25 pacientes, 22 (17.88%) presentaban Del22q11 (19 con la delección típica de 3 Mb y 3 con la delección más corta de 1.5 Mb), 2 poseían una duplicación corta de 1.5 Mb y 1 presentó una posible delección o variante de secuencia en *TBX1*. La presencia de desbalances se observó en 18 pacientes con CC aisladas y en 7 con otras anomalías mayores.

Tabla 18: Desbalances genómicos hallados con la técnica de MLPA P250 agrupadas según si presentaban o no otra anomalía mayor

	CCC			CC no C con sospecha de SDG		
	Con otra AM		Aislada	Con otra AM		Aislada
	Asociadas a 22q11	No asociadas a 22q11		Asociadas a 22q11	No asociadas a 22q11	
Analizables	7/7	16/17	76/78	5/5	4/4	15/16
rsa 22q11.2 (CLTCL1-LZTR1)x1	3	2	11	0	0	3
rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x1	1	-	1	-	-	1
rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x3	-	1	1	-	-	-
rsa 22q11.2(TBX1-7)x1	-	-	1	-	-	-

CC: Cardiopatía congénita, CCC: CC conotroncal, CC no C: CC no conotroncal, SDG: Síndrome DiGeorge. AM: anomalía mayor. rsa 22q11.2 (CLTCL1-LZTR1)x1: delección típica de 3 Mb; rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x1: delección corta de aproximadamente 1,5 Mb; rsa 22q11.2(CLTCL1-DGCR8)x3: duplicación corta de aproximadamente 1,5 Mb.

En la tabla 19 se detallan los resultados obtenidos para los diferentes tipos de CCC según fueran simples o complejas (asociadas a otra cardiopatía). En esta cohorte, nuevamente, el grupo de los pacientes con IAA fue el que presentó con mayor frecuencia desbalances en la región 22q11 (55%). Los otros grupos de CCC con altas frecuencias de desbalances fueron AP + CIV con un 40% y TAP con un 42%.

En la Tabla 20 se detallan los resultados obtenidos para los diferentes tipos de CCC según si eran aisladas o con otras anomalías mayores. En caso de poseer otras anomalías mayores, se consignó si las mismas estaban o no relacionadas al fenotipo esperado para el síndrome de Del22q11.

Tabla 19: Desbalances genómicos hallados en los diferentes tipos de CCC simples o complejas.

	TDF		TAP		TGV		IAA		AP + CIV		DSVD	
	Simples	Complejas	Simples	Complejas	Simples	Complejas	Simples	Complejas	Simples	Complejas	Simples	Complejas
N	23	2	5	2	11	19	3	6	8	7	1	10
Del 22q11	6	-	2	1	-	-	1	2	2	2	-	-
Otro desbalance	-	1 ¹	-	-	-	1 ²	1 ³	1 ⁴	1 ⁴	1 ³	-	-

N: Número de pacientes con CCC analizados, TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Trasposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP + CIV: Atresia Pulmonar con comunicación interventricular, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho.¹: rsa 18p11.32(P070-B3)x3,18q23(P070-B3)x3, ²: rsa 22q11.2 (TBX1-7)x1, ³: rsa 22q11.2 (CLTCL1-DGCR8)x3, ⁴: rsa 22q11.2 (CLTCL1-DGCR8)x1.

Tabla 20: Desbalances genómicos hallados para las diferentes CCC agrupadas según si presentaban o no otra anomalía mayor

	TDF			TAP			TGV			IAA			AP+CIV			DSVD		
	C/otra AM		Aislada	C/otra AM		Aislada	C/otra AM		Aislada	C/otra AM		Aislada	C/otra AM		Aislada	C/otra AM		Aislada
	Asoc. 22q11	NA		Asoc. 22q11	NA		Asoc. 22q11	NA		Asoc. 22q11	NA		Asoc. 22q11	NA		Asoc. 22q11	NA	
N	3	3	18	1	2	4	1	2	28	1	3	5	1	1	13	0	2	10
Del22q11	1	1	4	1	1	1	1	0	0	0	1	2	1	0	3	0	0	0
Otro desbalance	-	1 ¹	-	-	-	-	-	-	1 ²	-	1 ³	1 ⁴	1 ³	1 ⁴	-	-	-	-

N: Número de pacientes con CCC analizados, TDF: Tetralogía de Fallot, TAP: Tronco Arterioso Persistente, TGV: Transposición de Grandes Vasos, IAA: Interrupción de Arco Aórtico, AP: Atresia Pulmonar, DSDV: Doble Salida Ventrículo Derecho; C/otra AM: con otra anomalía mayor; Asoc. 22q11: asociada a 22q11; NA: con una anomalía mayor no asociada a 22q11; SM: Secuenciación masiva; ¹:18p11.32(P070-B3)x3,18q23(P070-B3)x3, ²: rsa 22q11.2 (TBX1-7)x1;³:rsa 22q11.2 (CLTCL1-DGCR8)x1; ⁴:rsa 22q11.2 (CLTCL1-DGCR8)x3.

IV.2.2.2 (GRUPO B) Análisis de VNTRS para la muestra PID 100H1

En el presente estudio se utilizó la técnica de VNTRS para analizar una muestra de líquido amniótico del paciente PID 100H1, así como de ADN extraído de sangre periférica de sus padres (PID 100P y PID 100M, respectivamente), para excluir la presencia de contaminación de sangre materna en la muestra de las vellosidades. Los VNTRS analizados fueron PentaE, THO1 y D16S539. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18. Como se observa, no se detectó contaminación de sangre materna en la muestra de vellosidad del paciente PID100H1. Los perfiles genéticos obtenidos muestran resultados consistentes con la herencia paterna y materna esperada en cada uno de los marcadores estudiados.

IV.2.2.3 (GRUPO B) Análisis de microarreglos de ADN por hibridación genómica comparada (array-CGH)

Entre los pacientes de la cohorte en estudio, se seleccionaron un total de 43 muestras de ADN provenientes de pacientes con ACM que fueron evaluadas mediante array-CGH. Encontramos 10 CNVs clínicamente relevantes (patogénicas o probablemente patogénicas) en 9 pacientes (20,9%). La Tabla 21 resume las características clínicas de los 9 pacientes, junto con la localización, tipo y tamaño de los desbalances implicados. Además, encontramos 3 CNVs clasificadas como VUS en 3 pacientes (Tabla 22).

IV.2.2.4 (GRUPO B) Análisis de secuenciación masiva (SM)

Tras el análisis por SM, 10 de 16 (62%) pacientes presentaron variantes genéticas patogénicas o probablemente patogénicas. Cuatro de estas variantes, en los genes *KAT6B*, *MYH11*, *EP300* y *MYH7*, son noveles. La Tabla 22 resume los fenotipos de los pacientes y las variantes genéticas que se encontraron.

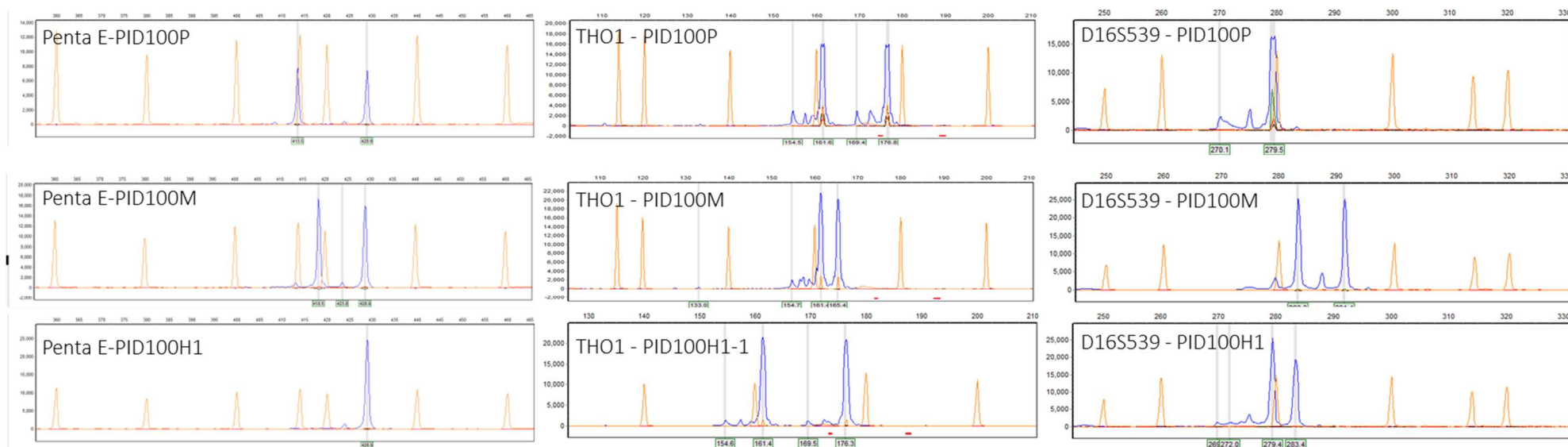


Figura 18: Electroforesis capilar de las PCRs fluorescentes realizadas para el análisis de VNTRs del caso PID 100H1, PID 100P (padre) y PID 100M (madre). En amarillo se observan los picos del marcador molecular fluorescente utilizado (Lis600) y en azul los picos obtenidos para las amplificaciones de los VNTRs. **Penta E:** PID 100P: 413 pb y 428 pb, PID 100M: 418 pb y 428 pb, PID 100H1: homocigota 428 pb. **THO1:** PID 100P: 161 pb y 176 pb, PID 100M: 161 pb y 165 pb, PID 100H1: 161 pb y 176 pb. **D16S539:** PID 100P: homocigota 279 pb, PID 100M: 283 pb y 291 pb, PID 100H1: 279 pb y 283 pb.

Tabla 21: Detalle del fenotipo, la localización cromosómica y la longitud de las CNVs clínicamente relevantes halladas en los pacientes.

Paciente	Género	Fenotipo	Cariotipo	Anomalía	Mb	Clasificación (ACMG)	OMIM #	ORPHA #	Referencia
PID 2	F	Fisura palatina, rasgos faciales dismórficos, CIA, CIV, clinodactilia del quinto dedo, retraso del crecimiento, baja estatura, hipertelorismo, fisura palpebral inclinada hacia arriba, puente nasal plano, micrognatia, comisuras de la boca hacia abajo, retraso del desarrollo, reflujo gastroesofágico.	46,XX	arr[GRCh37] 2q24.2q31.1(160347642_174075851)x1	13.73	Patogénica (2A,3C,4L)	-	1617	[180,181]
PID 41	M	Pie equinovaro bilateral, agenesia parcial del cuerpo calloso, DAP.	46,XY	arr[GRCh37] 7q11.23(72766313_74042787)x3	1.27	Patogénica (2A,4L)	609757	261102	[182]
PID 100H11	F	Síndrome de megavejiga-microcolon-hipoperistalsis intestinal, CIA.	Fracasó	arr[GRCh37] 16p13.11(15551302_16194578)x1pat	0.64	Patogénica (2A,4L)	619351	2241	[183,184]
PID 134	M	RCIU, anomalía de Ebstein, CIV, diástasis de sutura, fontanelas anchas, oídos displásicos. hidrocefalia comunicante, ventrículos laterales asimétricos, varedes ventriculares asimétricas. Quiste bilocular subependimario izquierdo.	Fracasó	arr[GRCh37] 1p36.33p36.23(834101_7930605)x1; 7q35q36.3(146927174_159128556)x3 ^{2,3}	7.1; 12.2	Patogénica (2A,3C,4L)X2	607872	1606	[185–188]
PID 147	M	Braquiplagiocefalia, frente ancha, fisuras palpebrales estrechas, nariz corta, punta ancha y fosas nasales anchas, fisura de paladar duro y blando, orejas bajas, cuello corto, EP, dedos superpuestos, surco plantar transversal. Dandy Walker vs hipoplasia del vermis cerebeloso, dilatación pielocalicial. Movimientos horizontales repetitivos de la cabeza, ligero retraso madurativo.	46,XY	arr[GRCh37] 15q14(33809650_40027263)x1	6.22	Patogénica (2A,3B,4L)	616898	261190	[173,189]

Paciente	Género	Fenotipo	Cariotipo	Anomalía	Mb	Clasificación (ACMG)	OMIM #	ORPHA #	Referencia
PID 149 ⁴	M	Estatura baja, microcefalia, fisuras palpebrales cortas, cejas pobladas, hipoplasia malar, nariz larga, prognatismo, paladar estrecho, boca pequeña, frenillo oral múltiple, escápula alada, sinostosis radiocubital, paresia braquial izquierda (probablemente post quirúrgica), camptodactilia reducible en ambas manos, rigidez articular general, hernia inguinal bilateral, CIV, EP, agenesia renal unilateral, poliposis intestinal, fusión de vértebras cervicales, disminución general del tejido graso, hipertrofia muscular, retraso mental (leve a moderado)	46,XY	arr[GRCh37] 5q22.2(112155123_112174165)x1pat	0.02	Patogénica (2E,4L)	-	261584	[190,191]
PID 167	M	Fisura labial completa bilateral, cejas escasas, coloboma retiniano del ojo izquierdo, pequeñas fisuras palpebrales, CIV perimembranosa, CoA, riñones de mayor tamaño y mala diferenciación corticomedular, probable poliquistosis renal, criptorquidia bilateral. Hipocalcemia	Fracasó	arr(13)x3	-	Patogénica	-	3378	[192]
PID 329	F	RCIU, Retrognatia, nariz ancha, nacimiento del cabello bajo, mordida asimétrica, fisura palatina velo del paladar corto y disfuncional, EP, defecto de segmentación vertebral torácica, retraso en el desarrollo neurológico, hipotrofia de pantorrilla y antebrazos.	46,XX	arr[GRCh37] 19q13.42q13.43(55434660_56463734)x1	1,03	Patogénica (2A, 3C)	-	-	
PID 362	M	Fisura palatina, rasgos faciales dismórficos, CIA, CIV, clinodactilia del quinto dedo, retraso del crecimiento, baja estatura, hipertelorismo, fisura palpebral inclinada hacia arriba, puente nasal plano, micrognatia, comisuras de la boca hacia abajo, retraso del desarrollo, reflujo gastroesofágico	Fracasó	arr[GRCh37] 3p21.31(44948482_49115809)x1dn	4.1	Patogénica (2A,3C,4L)	-	-	[193–196]

¹: Paciente estudiado inicialmente por SM (ver tabla 24). ²: Los padres presentaron cariotipo normal. ³: FISH: ish der(1)t(1;7)(p36;p35)(subtel1p-,subtel7q+,subtel1q+). ⁴: Este paciente fue estudiado además por SM (ver tabla 25). ACMG: Los criterios de patogenicidad utilizados son los recomendados por el *American College of Medical Genetics and Genomics* y el *Clinical Genome Resource* [154]. CIV: comunicación interventricular; CIA: comunicación interauricular; DAP: Ductus arterioso persistente; EP: Estenosis pulmonar; CoA: Coartación de aorta; RCIU: Retraso del crecimiento intrauterino; TDF: Tetralogía de Fallot.

Tabla 22: CNVs halladas por array-CGH clasificadas como VUS

Paciente	Género	Fenotipo	Cariotipo	Anomalía	Mb	Clasificación (ACMG)
PID 203	M	Mielomeningocele dorsal bajo (5 x 5 cm), hidrocefalia, fusión de costillas, agenesia de costillas izquierdas, DAP.	46, XY	arr[GRCh37] 3p26.3(1125700_1197682)x1 ¹	0.07	VUS (2C)
PID 211	M	Fisura de labio y paladar unilateral, hipertelorismo, orejas de implantación baja, atresia tricuspídea, IAA, CIV.	46, XY	arr[GRCh37] 20p13(489033_898472)x3	0.41	VUS (2K,4L)
PID 349	M	RCIU, dismorfias faciales, CIV subaórtica, hipospadias, hernia inguinal.	Fracasó	arr[GRCh37] 9p24.3(204193_349093)x3	0,14	VUS (2K,4L,4N,4O)

RCIU: Retraso del crecimiento intrauterino; CIV: Comunicación interventricular; IAA: Interrupción del arco aórtico; DAP: Ductus arterioso persistente. ¹: Analizado con ISCA 4x180. ACMG: Los criterios de patogenicidad utilizados son los recomendados por el *American College of Medical Genetics and Genomics* y el *Clinical Genome Resource* [154].

Tabla 23: Variantes clínicamente relevantes encontradas por análisis SM y fenotipos de los pacientes.

Paciente	Género	Fenotipo	Gen	Variante	Cambio proteico	Clasificación	Referencia
PID 100 H1 ¹	F	Síndrome de megavejiga-microcolon-hipoperistalsis intestinal, CIA.	<i>MYH11</i>	(NM_001040114.2):c.3143-2_3145delAGTGC ^{2,3}	p.?	Patogénica (PM3, PVS1, PM2)	[184,197]
PID 114 ⁴	M	Miocardiopatía septal hipertrófica asimétrica, estenosis subaórtica, hipertelorismo, criptorquidia derecha, epicanto, implantación baja del pabellón auricular.	<i>PTPN11</i>	(NM_002834.5):c.1381G>A	p.(Ala461Thr)	Patogénica (PM1, PP2, PM2, PM5, PP3) ⁷	[198,199]

Paciente	Género	Fenotipo	Gen	Variante	Cambio proteico	Clasificación	Referencia
PID 129	M	EP, CIA, Macrocefalia relativa, frente ancha, fisuras palpebrales descendentes, orejas poco abiertas, nariz fina, punta bulbosa, cuello corto sin pterigión, pectus excavatum (esternotomía), criptorquidia unilateral, hiperpigmentación lineal en cara interna de brazo y antebrazo derecho siguiendo la línea de blaschko, escoliosis. Sospecha de síndrome de Noonan.	<i>PTPN11</i>	(NM_001330437):c.922A>G	p.Asn308Asp	Patogénica (PP1, PS3, PS4, PS2, PM2, PM5, PM1, PP2) ⁷	[200]
PID 149 ⁵	M	Estatura baja, microcefalia, fisuras palpebrales cortas, cejas pobladas, hipoplasia malar, nariz larga prognatismo, paladar estrecho, boca pequeña, frenillo oral múltiple, escápula alada, sinostosis radiocubital, paresia braquial izquierda (probablemente post quirúrgica), camptodactilia reducible en ambas manos, rigidez articular general hernia inguinal bilateral, CIV, EP, agenesia renal unilateral, poliposis intestinal, fusión de vértebras cervicales, disminución general del tejido graso, hipertrofia muscular, retraso mental (leve a moderado).	<i>EP300</i>	(NM_001429.4):c.7081C>T	p.(Gln2361Ter)	Patogénica (PVS1, PM2)	[201–203]
PID 175 ⁴	M	FOP, CIV, EP, exceso de piel en nuca, pliegue transversal en puente izquierdo, tórax en escudo, pectus excavatum, criptorquidia bilateral, escroto pigmentado rugoso pequeño. Sospecha de síndrome de Noonan.	<i>PTPN11</i>	(NM_002834.3)c.181G>A	p.(Asp61Asn)	Patogénica (PS1, PM5, PM1, PP2, PM2, PP3) ⁷	[204–207]

Paciente	Género	Fenotipo	Gen	Variante	Cambio proteico	Clasificación	Referencia
PID 188	M	Cara inexpresiva, fisuras palpebrales cortas e inclinadas hacia arriba, ptosis, epicanto inverso, puente nasal alto y punta redondeada, orejas pequeñas de implantación baja, boca pequeña con comisuras hacia abajo y mayormente abierta, fisura de paladar, microrretrognatia severa, hipoplasia del nervio óptico, manos anchas con pulgares y hallux notablemente largos, CIV, genitales hipoplásicos, criptorquidia bilateral, convulsiones hipotónicas, presentó dificultad para la alimentación y respiración que requirió traqueotomía.	KAT6B	(NM_012330.4):c.4572_4573 dupTA	p.(Thr1525IlefsTer25)	Patogénica (PVS1, PM2)	[208]
PID 232 ⁶	F	Agenesia parcial del cuerpo calloso, TDF, agenesia renal.	MYBPC3	(NM_000256.3):c.2176C>T	p.(Arg726Cys)	Probablemente Patogénica (PM1, PM2, PP3, PP5)	[21,209]
PID 333 ⁴	F	Miocardiopatía no compactada	MYH7	(NM_000257.4):c.671A>T	p.(Asn224Ile)	Probablemente Patogénica (PM1, PM2, PP3) ⁷	[210]
PID 335 ⁴	F	Frente prominente con malformación capilar plana, pelo escaso, fisura palpebral descendente, puente nasal bajo, ligera retrognatia, orejas caídas y giradas, Miocardiopatía hipertrófica. Fenotipo compatible con síndrome de Costello	RAF1	(NM_002880.4):c.770C>T	p.(Ser257Leu)	Patogénica (PS3, PM6, PM2, PM5, PM1, PP3) ⁷	[211]
PID 351 ^{4,6}	F	Miocardiopatía no compactada	MYBPC3	(NM_000256.3):c.2176C>T	p.(Arg726Cys)	Probablemente Patogénica (PM1, PM2, PP3, PP5)	[212]

Las variantes novedales se encuentran resaltadas en **negrita**. ¹: Esta variante fue encontrada inicialmente por SM en la paciente PID 100H1 y luego en su hermana PID 100 por secuenciación de Sanger; ²: En aparente homocigosis (ver figura 21). ³: Heredado de su madre heterocigota. ⁴: Analizado con el kit de secuenciación TruSight® cardio. ⁵: El paciente presentó también una delección de 0.02 Mb en 5q22.2 (ver Tabla 23) heredada de su padre afectado al igual que la variante hallada en *EP300*. ⁶: Pacientes no relacionados, ambos heredaron la variante de sus madres. ⁷: para los genes de Rasopatías y para el gen *MYH7* se siguieron las recomendaciones de ACMG y de ClinGen [169,170]. CIA: Comunicación interauricular; EP: Estenosis pulmonar; CIV: Comunicación interauricular; FOP: Foramen oval permeable; RCIU: Retraso del crecimiento intrauterino; TDF. Tetralogía de Fallot.

IV.2.3 (GRUPO B): Relación genotipo fenotipo para los desbalances genómicos hallados por array-CGH y para variantes de secuencia de relevancia clínica por SM.

En esta sección describiremos los resultados más relevantes de los hallazgos de array-CGH y SM.

En el paciente PID 2 se detectó una microdelección que comprende la región 2q24.2q31.1 mediante la técnica de array-CGH. Si bien la delección solapa la región crítica del Síndrome de Microdelección 2q24 (ORPHA: 1617), no se halló ningún otro paciente en la literatura o en las bases de datos con los mismos puntos de ruptura. Se describieron varias delecciones intersticiales en la región 2q24 en bases de datos, pero muchos de los casos reportados no poseen un fenotipo específico asociado y por lo tanto, la comparación y asociación del fenotipo con los posibles genes candidatos se dificulta.

Considerando la paciente descrita en esta tesis, hasta la fecha se describieron en la bibliografía 12 pacientes que poseen delecionada la región (Tabla 24, adaptada de Zhu y colaboradores [213]). Según se muestra en la tabla, la paciente de nuestra cohorte comparte gran parte de las características fenotípicas descritas, aunque algunas de estas no pudieron ser evaluadas debido a la edad temprana de la paciente al momento del estudio. Entre los 12 pacientes descriptos, 5 poseen defectos septales.

Zhu y colaboradores en su reporte y revisión de casos han propuesto 4 genes candidatos en la región como posibles causantes del fenotipo cardiaco: DLX1, DLX2, ATF2 y TTN [213]. Del grupo de genes propuestos, la paciente sólo presenta la delección de los genes DLX1 y 2, como se muestra en la Figura 19C. Varios de los pacientes reportados en la bibliografía -revisados en Zhu y colaboradores [213]- con delecciones en esta región no poseen coordenadas precisas de los puntos de ruptura debido a que fueron detectados por citogenética clásica, impidiendo determinar la presencia o ausencia de genes en la región afectada. Al comparar los puntos de ruptura de los 4 pacientes que poseen descripciones fenotípicas y coordenadas genómicas (Ver pacientes Lazier et al, Tsai et al, Stevenson et al y Zhu et al en [213]), se observa que 2 de estos casos no presentan defectos cardiacos ni delección de los genes DLX (ver pacientes Tsai et al y Stevenson et al en [213]). El paciente Lazier et al en [213] no presenta un fenotipo con CC, pero sí delección de los genes DLX y el paciente descripto por Zhu y colaboradores [213], sí posee CC y delección que incluye a los 4 genes propuestos.

En el paciente PID 41 se detectó una microduplicación que comprende la región crítica del síndrome de duplicación 7q11.23 (OMIM: 609757, síndrome de duplicación de la región de Williams-Beuren) (Figura 20). Según la literatura, las personas con duplicación 7q11.23 presentan una variedad de anomalías congénitas, si bien la frecuencia y gravedad de las mismas pueden variar [182]. El paciente presenta agenesia parcial del cuerpo calloso que, si bien no se la considera una característica típica del síndrome, se la halló con una frecuencia relativamente baja en algunos pacientes. El ductus arterioso persistente (DAP), por su parte, también fue descrito en algunos casos de síndrome de duplicación de la región de Williams-Beuren, pero al igual que la agenesia parcial del cuerpo calloso, no se considera una característica distintiva del síndrome. En cambio, dentro de las anomalías ortopédicas y musculoesqueléticas que pueden presentar, el pie equinovaro bilateral, si se ha descrito específicamente como una anomalía en este síndrome [182].

La paciente PID 100 fue incluida en el estudio desde su nacimiento ya que se encontraba bajo seguimiento ecográfico prenatal debido a la presencia de anomalías compatibles con el síndrome de megavejiga-microcolon-hipoperistaltismo intestinal (MMIHS) (OMIM:24210, 619351, 619365, 619431, 619431). Este síndrome es una enfermedad congénita grave, con una herencia generalmente autosómica recesiva, que se caracteriza por distensión vesical e hipoperistaltismo intestinal que provoca obstrucción intestinal funcional en el neonato, además de otras alteraciones. Para esta paciente, inicialmente se realizó un cariotipo al momento del nacimiento que fracasó. La calidad del ADN tampoco fue adecuada para realizar SM que hubiera sido conveniente dada la alta sospecha de este síndrome, para el cual se conoce que variantes en los genes *MYLK*, *MYH11*, *LMO1*, *MYL9*, *ACTG2* (este último gen con herencia AD, los otros de herencia AR), estarían asociados al desarrollo de la enfermedad. Lamentablemente la paciente falleció perinatalmente, por lo que no fue posible obtener una nueva muestra.

Tabla 24: Fenotipos de los pacientes hallados en la bibliografía con deleciones que involucran la región 2q24.2q31.1

	Lazier et al.	Tsai et al.	Svensson et al.	Pescucci et al.	Boles et al.	Dimitrov et al. [n = 5]	Zhu et al.	PID2
Bandas	2q24.3-q31.1	2q31.1-31.2	2q31.1	2q24.3-q31.1	2q24.2-q31.1	2q24.3-q32.1	2q24.3-q32.1	2q24.2q31.1
hg19	chr2:167462239-177905345	chr2:175791754-178991754	chr2:174572314-176559449	-	-	-	chr2: 165125352-183581904	chr2:160347642-174075851
Tamaño (Mb)	10,4	3,4	2,518	10,4	NS	2.74–16.9	18,46	13,73
Genero	F	F	F	F	M	1 M: 4 F	M	F
Altura al nacer	NE	NE	P10–25	P25–50	NE	2/5[MNN] (1/5 NE)	P25–50	NE
Peso al nacer	P10	<P3	P50–75	P10–25	2890 g	3/5[MNN] (1/5 NE)	P10–25	NE
Retraso madurativo	+	+	+	+	+	5	NA	+
Retraso del crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	+
Microcefalia	+	+	+	+	+	2	-	-
Anomalías del craneo	+	-	-	-	-	2 (Trigonocefalia)	-	-
Ptois/epicanto	+	-	-	+	+	4	-	-
Orejas bajas/displasias	-	+	+	+	+	2	-	-
Anomalia bilateral de extremidades	+	+	+	NE	+	4	+	-
Sindactilia	+	-	+	+	+	3	+	-
Campodactilia	+	-	-	-	+	1	+	-
Espacio amplio entre los dedos	+	-	-	+	+	2	+	-
clinodactilia	+	+	+	+	-	3	+	+
Dedos conicos	-	+	-	+	-	1	-	-
Halluces anchos	-	+	-	+	+	1	-	-
CC	-	-	-	NE	CIV	2 (Pacientes 1y2:CIV)	CIV, displasia aortica	CIA, CIV
Estrabismo	+	-	+	-	-	2	-	-
Paladar hendido	-	-	-	+	+	1	-	+
Otros	-	-	-	-	-	-	-	Fisuras palpebrales ascendentes, puente nasal plano

MNN: Medida normal al nacimiento, NE: No especificado, NA: no aplica, +: presente, -: ausente. Adaptada de Zhu y colaboradores 2022 [213]



Figura 19: Desbalance hallado por Array-CGH en el paciente PID 2. **A:** Ideograma del cromosoma 2 con la región delecionada marcada en rojo (2q24.2q31.1), debajo el resultado del array-CGH: el eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Los puntos rojos son las sondas cuya relación está por debajo del 0 y los azules aquellas que se encuentran por arriba de 0. La región delecionada se marca con una línea roja por debajo. **B:** Se representa la región del cromosoma 2 donde se localizan CNVs de varios pacientes con desbalances desde la coordenada 160000000 hasta la 180000000 (GRCh37): en celeste el paciente PID 2, en rojo el caso con CC reportado por Zhu y colaboradores [213], en gris y en verde los casos que poseen coordenadas cromosómicas revisados por estos autores y los genes propuestos, respectivamente.

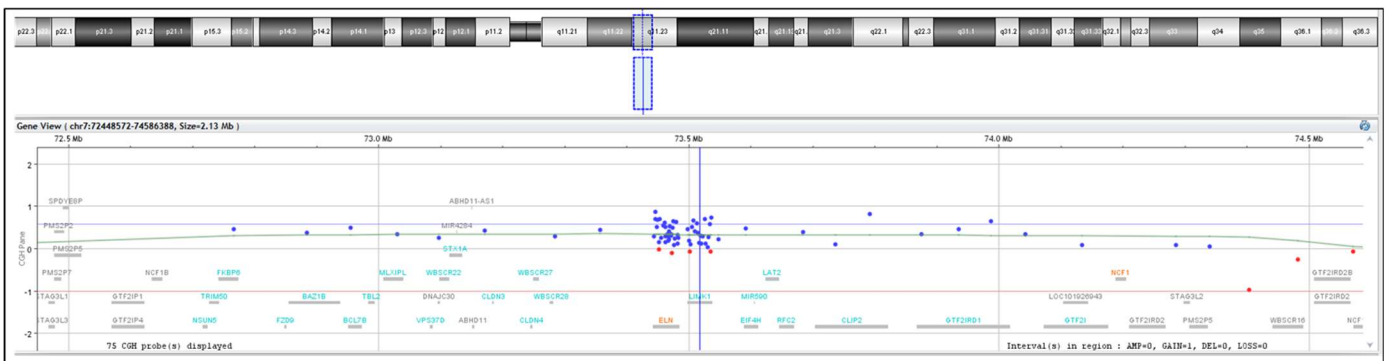


Figura 20: Desbalance hallado por array-CGH en el paciente PID 41. Arriba, ideograma del cromosoma 7 con la región duplicada marcada en azul (7q11.23). Abajo, el resultado del array-CGH: el eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Se representan las sondas que se encuentran en la región chr7:1988728-74820371 (GRCh37). Los puntos rojos son las sondas cuya relación se encuentra por debajo del 0 y los azules, aquellas que se ubican por arriba de 0. La región duplicada se marca con una línea azul por debajo.

A posteriori la familia comunicó que estaban cursando un nuevo embarazo con anomalías ecográficas (PID 100H1). Dado que se realizaría un cariotipo prenatal por los antecedentes y anomalías ecográficas detectadas, se le ofreció a la familia la posibilidad de extraer ADN del sobrante del cultivo para realizar el estudio de los genes candidatos mediante SM.

Se analizó el panel *in silico* de los 5 genes candidatos para esta patología y se halló la variante novel (NM_001040114.2):**c.3143-2_3145del** en aparente homocigosis en el gen *MYH11*. La variante es una delección de 5 pb que compromete 2 pb del sitio aceptor canónico de *splicing* en el intrón 25 y 3 pb del inicio del exón 26 (Figura 21A). Esta delección podría generar alternativamente la exclusión del exón 26 o el uso de otro sitio aceptor críptico de *splicing*. Ambas opciones podrían dar como resultado un cambio de marco de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro que conduciría a una proteína truncada no funcional o a la degradación de su ARNm por NMD.

Posteriormente, se secuenciaron por el método de Sanger las muestras de PID 100H1, de su hermana fallecida PID 100, del padre y de la madre (PID 100P y PID 100M, respectivamente). Los resultados se muestran en la Figura 21A. Como se observa, ambas pacientes presentaban la variante en aparente homocigosis, la madre presentaba la variante en heterocigosis y el padre no presentaba la variante. A los efectos de comprobar la posible hemicigosis de la región, analizamos la presencia de regiones de homocigocidad así como la profundidad de las lecturas lindantes al gen *MYH11* en los resultados de la SM de la muestra de la paciente PID 100H1. Se halló una región de aproximadamente 0.7-1 Mb de largo que presentaba homocigosis continua y una profundidad baja de lecturas.

Teniendo en cuenta el tamaño de la posible delección, se procedió a realizar un array-CGH en la muestra de PID 100 y PID100P. Los resultados (Figura 21B), confirmaron la presencia de una delección en el cromosoma 16 de al menos 643 Kb en ambos (arr[GRCh37] 16p13.11(15551302_16194578)x1pat). Por lo tanto, la paciente presentaba una delección de 5 pb en el gen *MYH11* heredada de su madre y una delección que abarca a este gen heredada de su padre.

Las variantes patogénicas reportadas hasta la fecha en *MYH11*, al igual que la variante familiar detectada en PID 100H1 en hemicigosis, son principalmente variantes de pérdida de función (LOF) como por ejemplo corrimientos del marco de lectura, variantes sin sentido y pérdidas de sitios de *splicing* [183,214,215]. Asimismo, no se han descrito variantes de este tipo que resulten

ser benignas o probablemente benignas en este gen. Nagamani y colaboradores [216] reportaron y revisaron las deleciones en esta región y propusieron varios tipos diferentes de deleciones/duplicaciones en función de la localización de tres intervalos de duplicaciones segmentarias en la región propuestas por Ingason y colaboradores [217]. La deleción presente en las pacientes y su padre se corresponde con el intervalo II que incluye los genes *MYH11*, *NDE1* y *ABCC6*.

Si bien el fenotipo MMIHS se encuentra asociado de forma autosómica recesiva al gen *MYH11*, el principal fenotipo cardíaco asociado a este gen es el DAP y la dilatación de la aorta torácica hereditaria (TAAD) con una herencia autosómica dominante [50]. Como las pacientes presentaron una CIA se revisó el panel de genes *in silico* para CC en búsqueda de otras variantes que expliquen el fenotipo cardíaco y no se detectaron variantes de relevancia clínica que se asociaran a CIA en otros genes.

Al no poseer variantes puntuales en otros genes ni otras CNVs que expliquen la presentación de la CIA, se analizaron las bases de datos y la bibliografía disponible para determinar si existe alguna posible asociación de este fenotipo con las variantes presentadas en las pacientes. No se describieron defectos septales para el gen *MYH11* ya sea para la forma AD ni para la forma AR. En particular, para el fenotipo MMIHS AR, la casuística es baja ya que sólo hay 5 casos reportados aparte de las pacientes incluidas en esta tesis [183,197,214,215,218]. En la base de datos ClinVar se registraron más de 40 CNVs similares consideradas como patogénicas, pero sin un fenotipo claramente definido. Además, en la base de datos DECIPHER se hallaron más de 50 casos de CNVs similares. En los casos donde se describió un fenotipo, las características observadas incluyeron discapacidad intelectual, convulsiones, anomalías cerebrales y baja estatura. Sólo un caso dentro de DECIPHER (Paciente: 338676) presentó una CC septal (CIV), si bien es importante mencionar que no podría adjudicarse causalidad, ya que este paciente también presentaba una Del22q11 que es una causa conocida de CIV sub aórticas.

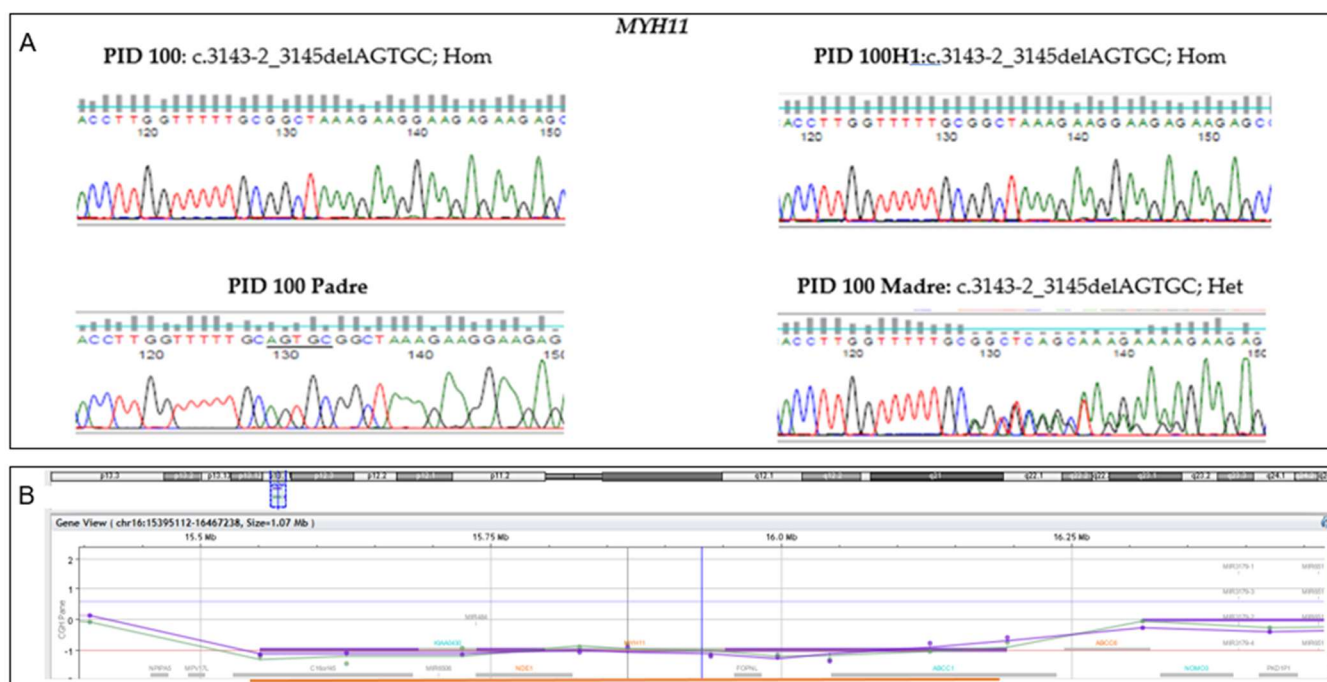


Figura 21: Electroferogramas representativos de la secuenciación de Sanger de muestras de la familia del PID100 y desbalance hallado por array-CGH en las muestras PID100H1 y PID100P. A: Electroferogramas parciales de la secuenciación de Sanger del gen *MYH11* de la paciente PID 100 su hermana y padres. Las flechas rojas indican la posición de la variante. La línea horizontal en PID 100P representa la delección de 5pb detectada en las pacientes. Hom: homocigota, Het: heterocigota. **B:** Arriba: Ideograma del cromosoma 16 con la región delecionada (16p13.11) en PID 100H1 marcada en verde y en violeta, la de su padre PID 100P. Abajo: resultado del array-CGH, el eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Se representan las sondas que se encuentran en la región chr16:15395112-16467238(GRCh37). Los puntos verdes y violetas representan el resultado obtenido para cada sonda de la paciente PID 100H1 y su padre PID 100P, respectivamente, La región delecionada en común es aquella que se subraya en rojo.

Mediante SM se detectó en el paciente PID 114 la variante (NM_002834.5):c.1381G>A en el gen *PTPN11*. Esta variante, que fue luego confirmada por secuenciación de Sanger (Figura 22A), predice el cambio p.(Ala461Thr), se encuentra ubicada en el motivo proteico(I/V)HCXAGXGR(S/T)GT) que define a la familia PTP y afectaría su función catalítica [199]. La variante fue previamente reportada en dos pacientes [198,219]. PID 114 comparte las principales características como ser, baja talla, miocardiopatía hipertrófica, sordera y criptorquidia con el primer paciente reportado por Yoshida y colaboradores [198], si bien no comparte características clínicas con el paciente 5 descrito por Croonen y colaboradores [219].

El paciente 129 presentó la variante recurrente (NM_001330437):c.922A>G (p.Asn308Asp) en el gen *PTPN11* (Figura 22B). Esta variante se describió en una frecuencia que oscila entre el 18 y el 31% de los pacientes con el diagnóstico clínico de síndrome de Noonan [200] y al igual que

la variante anterior, se encuentra en el dominio PTP.

La variante que se halló en el paciente 175 (Figura 22C), p.Asp61Asn (c.181G>A), fue descrita en la literatura en al menos 7 individuos con síndrome de Noonan y el fenotipo del paciente de nuestra cohorte es consistente con la descripción de los signos reportados en bibliografía [204–207].

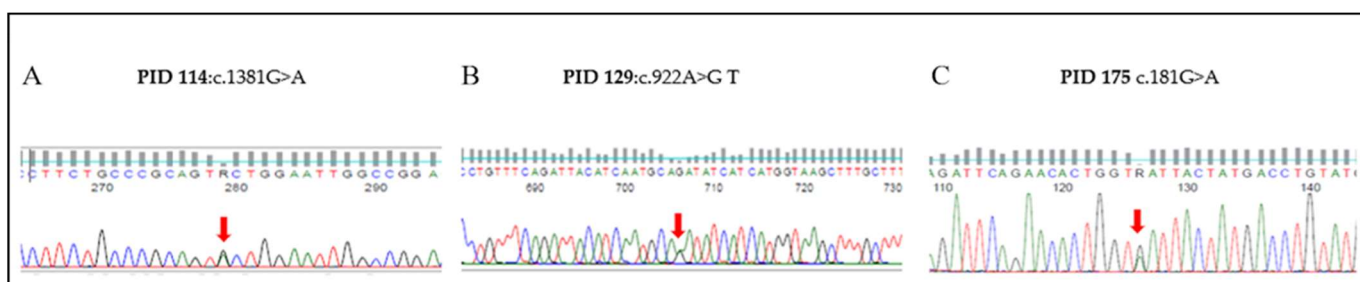


Figura 22: Electroferogramas representativos de la secuenciación de Sanger de pacientes en los que se encontraron variantes clínicamente relevantes en el gen *PTPN11*. Las flechas rojas indican la posición de las variantes halladas.

La muestra del paciente PID 134 ingresó al estudio postmortem con un cariotipo que había fracasado. Se prosiguió entonces con el análisis de array-CGH que arrojó como resultado la presencia de dos desbalances: una delección en el cromosoma 1 región p36 y una duplicación en el cromosoma 7 región q35 (arr[GRCh37] 1p36.33p36.23(834101_7930605)x1; 7q35q36.3(146927174_159128556)x3) (Figura 23). Esta muestra presentaba en el array-CGH un DLRS (valor que indica la dispersión de los resultados del estudio) mayor a 0,30 (que es el máximo aceptable). Para confirmar el hallazgo se realizó un MLPA de regiones subteloméricas (Figura 24) con el kit P070-B2 (que incluye sondas para los *loci* *TNFRSF18* del cromosoma 1 y *VIPR2* del cromosoma 7), donde se detectaron 2 desbalances en el cromosoma 1 y en el 7, respectivamente (Figura 24).

A partir de estos resultados, planteamos la hipótesis de que estos 2 desequilibrios se debían a un reordenamiento intercromosómico, dando lugar a un cromosoma derivado. Se solicitó que se remitan al laboratorio de citogenética muestras parentales para un análisis de cariotipo. Asimismo, se solicitó la realización de un estudio de las regiones subteloméricas 1p36 y 7q35 mediante la técnica de FISH con muestra remanente de los estudios citogenéticos realizados en el paciente. Los resultados obtenidos de los cariotipos parentales no mostraron anomalías cromosómicas y el análisis de FISH confirmó que se trataba de un derivado del cromosoma 1 ish der(1)t(1;7)(p36;p35)(subtel1p-,subtel7q+,subtel1q+).



Figura 23: Desbalances hallados por array-CGH en el paciente PID 134. **A:** Arriba, ideograma del cromosoma 1 con la región delecionada marcada en rojo (1p36.33p36.23). Abajo, el resultado del array-CGH. La región delecionada se marca con una línea roja por debajo. **B:** Arriba, ideograma del cromosoma 7 con la región duplicada marcada en azul (7q35q36.3). Abajo, resultado del array-CGH. La región duplicada se marca con una línea azul por debajo. En los resultados del array-CGH de ambas figuras, el eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. El eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de la fluorescencia muestra / referencia. Los puntos rojos son las sondas cuya relación de fluorescencia se hallaba por debajo del 0 y los azules corresponden a relaciones de fluorescencia por arriba de 0

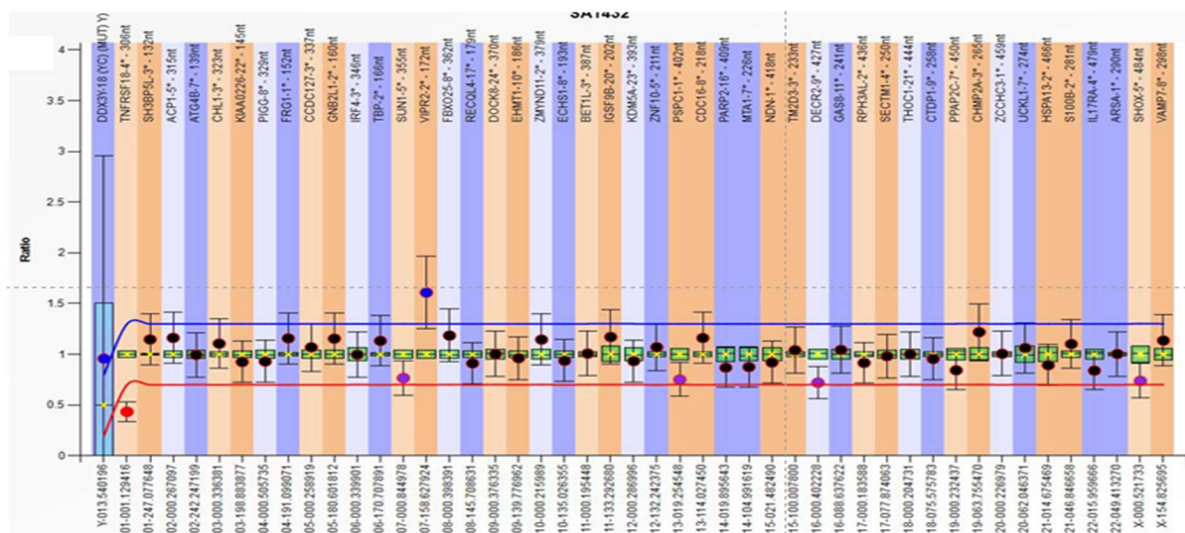


Figura 24: Gráficos representativos del análisis de los resultados de MLPA utilizando el kit P070-B2 del paciente PID134. Cada punto representa una sonda del kit, que posee 2 sondas para cada cromosoma. Una deleción se grafica con puntos rojos, mientras que una duplicación, con puntos azules.

El paciente PID 147 ingresó con un cariotipo normal y debido a su fenotipo con múltiples anomalías (Tabla 21) se procedió a su análisis por array-CGH. Los resultados se muestran en la Figura 25. Como se observa, se halló, una delección en la región 15q14 de 6.22 Mb (arr[GRCh37] 15q14(33809650_40027263)x1). Esta delección compromete la región responsable del síndrome de delección 15q14 (OMIM # 616898 PW). La mayoría de las características fenotípicas que presentó el paciente están descritas en la literatura para este síndrome entre ellas, la estenosis pulmonar [173,189]. Las características principales se asocian a la haploinsuficiencia del gen *MEIS2* e incluyen defectos palatinos, cardíacos y discapacidad intelectual.

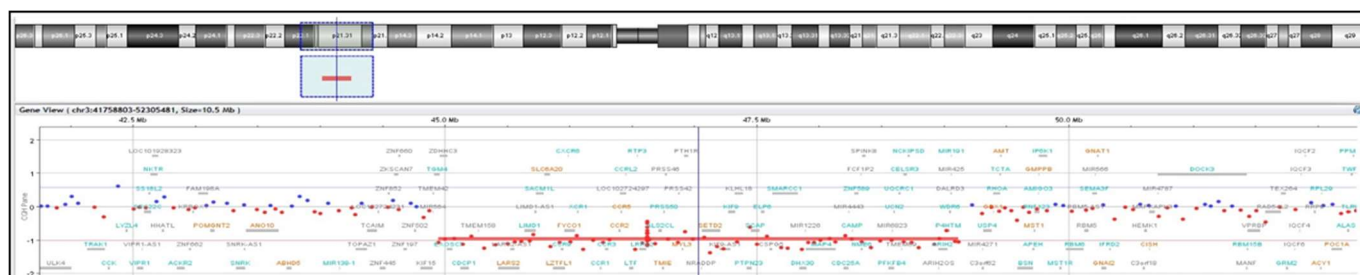


Figura 25: Desbalances hallados por array CGH en el paciente PID 147. Arriba: Ideograma del cromosoma 15 con la región delecionada marcada en rojo (15q14). Abajo, el resultado del array-CGH. El eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según las coordenadas cromosómicas desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Se representan las sondas que se encuentran en la región chr15:32477304-41359608 (GRCh37). Los puntos rojos son las sondas cuya relación de fluorescencia se hallaba por debajo del 0 y los azules corresponden a relaciones de fluorescencia por arriba de 0. La región delecionada en el paciente se marca con una línea roja.

El paciente PID149 presentaba un cariotipo normal con un fenotipo complejo. En particular llamaba la atención la poliposis intestinal que también estaba presente en su padre y su abuela paterna (Figura 26 A). El análisis del array-CGH (Figura 26 B) reveló una delección en el gen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) que comprende desde el exón 11 hasta parte del 16 del gen (Figura 26 C, Tabla 21). Esta delección daría como resultado una proteína trunca no funcional o la degradación de su ARNm por NMD. Se estudiaron por la misma técnica a los padres, y se confirmó la presencia de la delección en el padre afectado.

La presencia de variantes de secuencia y de delecciones en el gen *APC* son la principal causa genética de la poliposis familiar adenomatosa [190,191]. Este gen se relaciona también al síndrome de Gardner (OMIM: # 175100), si bien la presencia de la cardiopatía y otras características fenotípicas del paciente no se ajustan a este síndrome. Se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar si existe relación entre el gen y el resto del fenotipo, pero no existe

mucha información que asocie al gen *APC* con cardiopatías congénitas, a excepción de un estudio realizado por Ye y colaboradores donde postulan que *APC* desempeñaría un papel importante en el desarrollo del corazón como un regulador negativo de la vía de señalización canónica de *Wnt* [220].

Teniendo en cuenta que el fenotipo complejo que presentaba el paciente podía sólo ser parcialmente explicado por la delección, realizamos SM seguido del análisis *in silico* de nuestra lista de genes de interés. Se halló una variante patogénica en el gen *EP300* validada luego por el método de Sanger (Figura 27A) y que también estaba presente el padre. El cambio (NM_001429.4):c.7081C>T hallado codifica para un codón de terminación prematuro en el último exón del gen (exón 31) (Figura 27B) lo que generaría una proteína trunca con 54 aminoácidos menos.

Las variantes patogénicas en *CREBBP* y *EP300* son causas bien conocidas del síndrome de Rubinstein-Taybi 1 y 2. Las variantes en *EP300*, principalmente en el dominio HAT (dominio acetil transferasa de histonas), están asociadas con el síndrome de Rubinstein Taybi 2 (RTS2 OMIM #613684), mientras que las variantes ubicadas fuera de este dominio proteico pueden conducir a un amplio espectro de fenotipos [201,202].

La variante hallada en este paciente está ubicada en la región carboxi terminal de la proteína y fuera del dominio HAT, pero las características del paciente se solapan con las características clínicas que se observan a menudo en RTS2, como ser retraso del crecimiento postnatal, microcefalia, discapacidad intelectual, anomalías cardiovasculares, anomalías renales y anomalías vertebrales cervicales [201,202,221]. Existen 3 variantes reportadas como patogénicas río abajo de la detectada en este estudio, la variante c.7100delC (p.P2366fsX2401) con un fenotipo no clásico de RTS2 [222], la variante c.7222_7223del (p.(Gln2408Glufs*39) presente en una madre y su hija afectadas con RTS [223], y por último una variante de pérdida de codón de terminación reportada en ClinVar como patogénica (RCV001027441.1) asociada a RTS2.

La mayoría de las variantes de *EP300* notificadas son *de novo* [223]. Si bien esta observación podría representar un argumento en contra de la posible patogenicidad de la variante hallada en el paciente de nuestra cohorte, se han descrito dos pacientes con variantes en este gen heredadas, uno con una variante heredada de una madre sintomática leve [223] y el otro con una variante heredada de un padre asintomático [201].

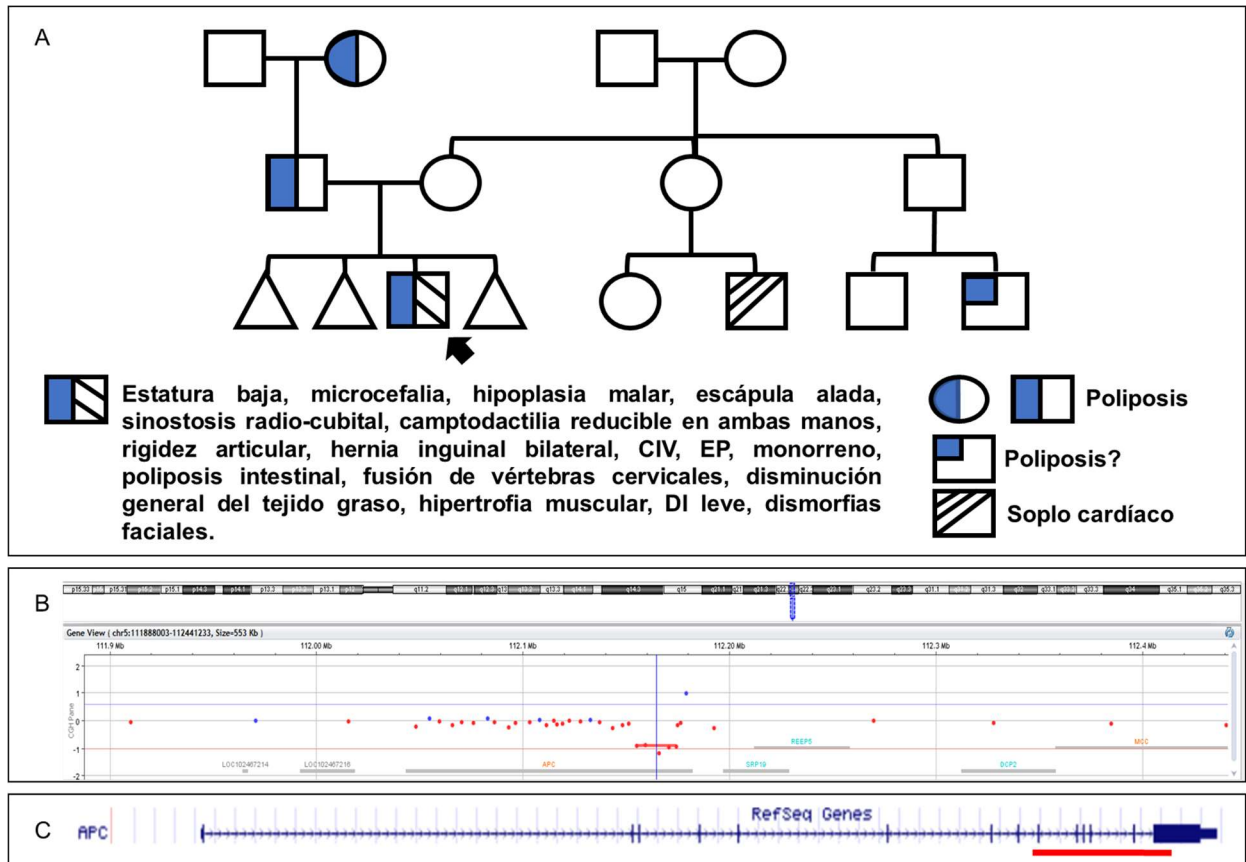
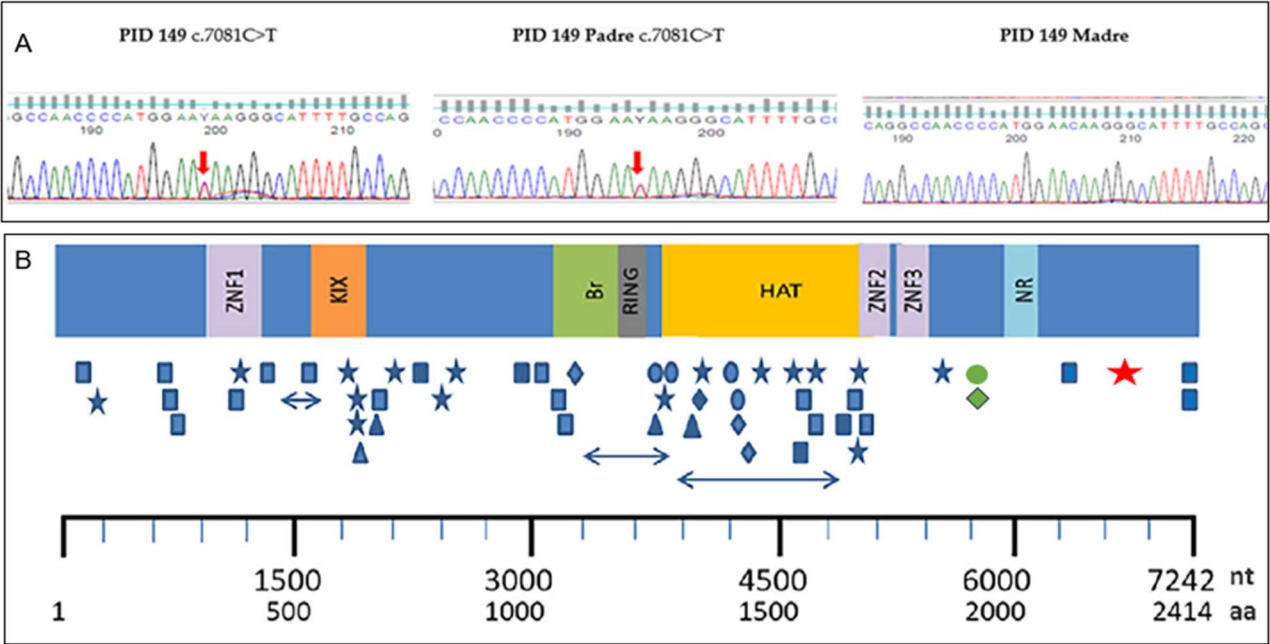


Figura 26: Desbalance hallado por array-CGH en el paciente PID149 por array-CGH: A: Árbol genealógico. B: Arriba, Ideograma del cromosoma 5 con la región delecionada marcada en azul (5q22.2), Abajo, resultado del array-CGH: el eje Y representa el log en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Se representan las sondas que se encuentran en la región chr5:111888003-112441233 (GRCh37). Los puntos rojos son las sondas cuya ratio dio por debajo del 0 y los azules aquellas que dieron por arriba de 0, La región delecionada se marca con una línea roja. C: Esquema del gen APC los exones señalados por una línea roja corresponden a la región delecionada del gen.

Figura 27: Variante hallada por SM en el gen EP300 en el paciente PID149. A: Electroferogramas parciales de la secuenciación de Sanger del gen EP300 del paciente, padre y madre. B: Diagrama de las regiones codificantes del gen EP300 (adaptado de Menke y colaboradores [202]). Se representan los diferentes dominios proteicos: ZNF1, KIX, Br, RING, HAT, ZNF2, ZNF3 y NR. Debajo del diagrama en azul se representan las variantes reportadas y revisadas por los Menke y colaboradores [202], en verde las variantes que presentan el nuevo fenotipo descrito por los autores y en rojo la variante que presentó el paciente PID 149. Cuadrado: variantes de cambio del marco de lectura, estrella: variantes sin sentido, flecha horizontal: deleción intersticial, triángulo: sitio de *splicing*, rombo: indel en marco de lectura, círculo:



variante de cambio de sentido.

La muestra del PID167 ingresó al estudio post-mortem con un cariotipo que había fracasado, por lo que se la incluyó en el análisis de array-CGH. Mediante este estudio se halló una ganancia del brazo largo del cromosoma 13 completo (Figura 28). El fenotipo que presentaba el paciente (Tabla 22) era consistente con la descripción del síndrome de Patau [192].

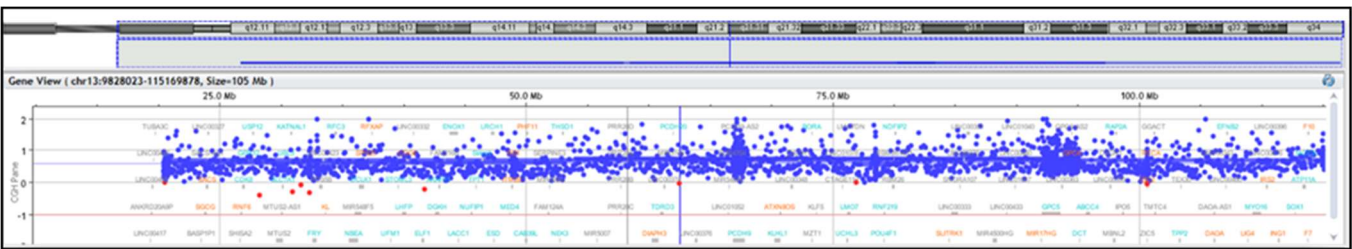


Figura 28: Desbalance hallados por array- CGH en el paciente PID 167. Arriba, ideograma del cromosoma 13 con la región en ganancia marcada en azul. Abajo: resultado del array-CGH, el eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según las coordenadas cromosómicas desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Los puntos rojos son las sondas cuya relación de fluorescencia se hallaba por debajo del 0 y los azules corresponden a relaciones de fluorescencia por arriba de 0. Se observan todos los puntos en ganancia, resultado compatible con una trisomía 13.

El análisis de SM reveló una variante novel heterocigota (NM_012330.3) c.4572_4573dup (p.(Thr1525Ilefs*25)) en el gen *KAT6B* que se confirmó por secuenciación de Sanger (Figura 29B) en el paciente PID188. Esta variante es una duplicación de 2 pb en el exón 18 que resulta en un corrimiento del marco de lectura, reemplazo de la treonina por isoleucina en la posición 1525 que genera una proteína con 24 aminoácidos diferentes e introduce un codón de terminación prematuro en 25 codones luego del cambio (Figura 29 D). La variante se localiza en el dominio rico en Asp/Glu de la proteína y predice una proteína trunca que carecería del dominio carboxiterminal Ser/Met. No se halló esta variante en bases de datos públicas (ClinVar, ExAC, NHLBI GOExome Sequencing Project, Global Variom Shared LOVD, etc), ni en la literatura. Se analizaron muestras de ambos padres mediante secuenciación de Sanger las cuales resultaron negativas para la duplicación (Figura 29C), por lo que se deduce que se trata de una variante *de novo*.

El gen *KAT6B* codifica una histona acetiltransferasa y un componente del complejo MOZ/MORF. Además de su actividad acetiltransferasa, la proteína tiene una región en su extremo N-terminal que posee funcionalidad como activador transcripcional y una región en su extremo C-terminal que actúa como represor transcripcional. Esta proteína es necesaria para la activación transcripcional de *RUNX2* y estaría involucrada en el desarrollo del cerebro. *KAT6B* es responsable de dos síndromes, el síndrome genitopatelar (GPS, OMIM:606170) y el síndrome Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson (SBBYS, OMIM:603736).

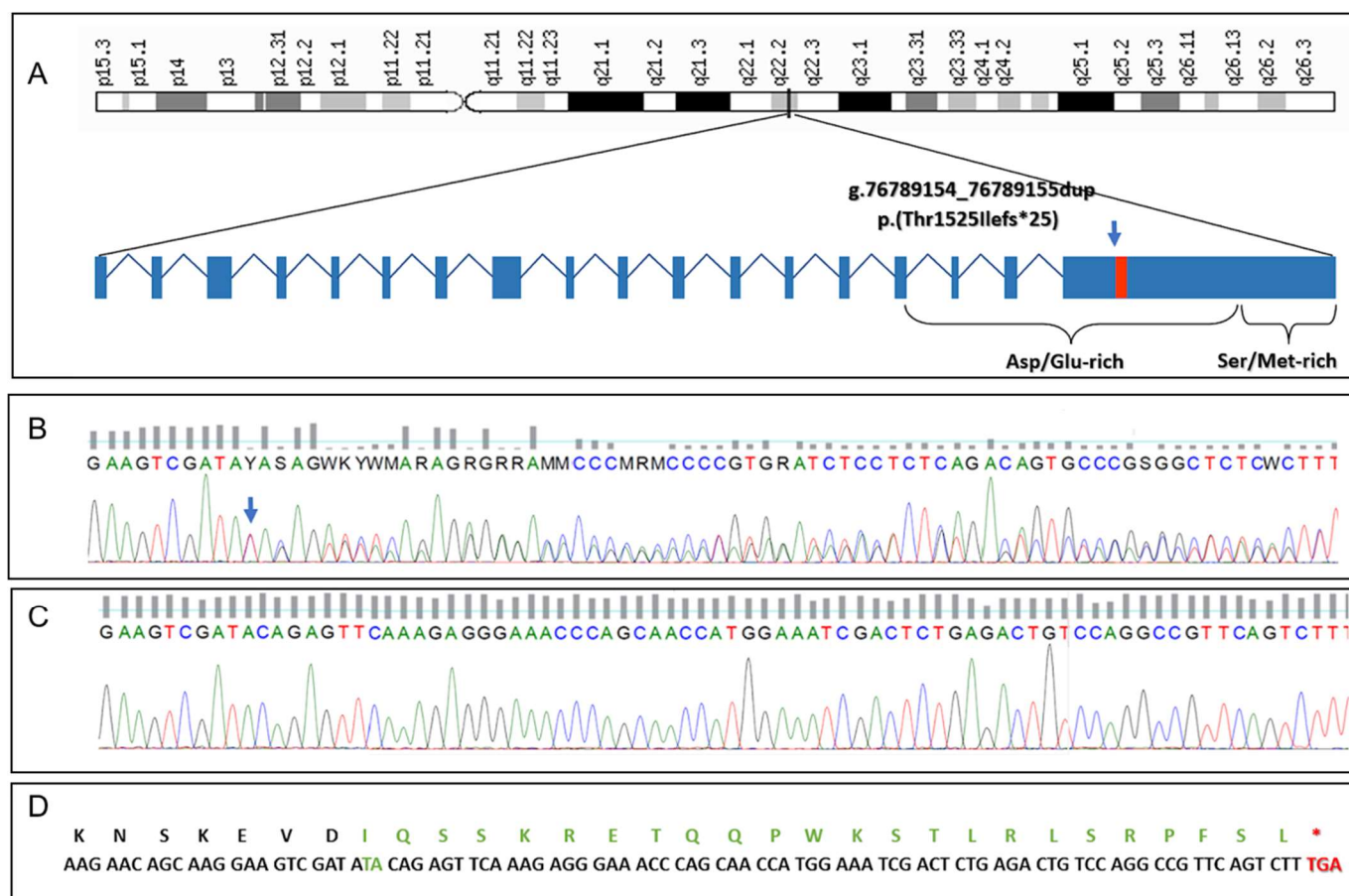


Figura 29. Ubicación cromosómica, representación del gen *KAT6B* y resultados de la secuenciación de Sanger de la variante hallada en el paciente PID 188. **A.** Arriba: Diagrama que muestra la ubicación del gen *KAT6B* en el cromosoma 10q22.2. Abajo: Esquema del gen *KAT6B* (NG_032048.1). Marcada con una flecha azul vertical se muestra la posición de la variante detectada en el paciente con su nomenclatura genómica y a nivel de la proteína (NP_036462.2). El rectángulo rojo representa a los 24 aminoácidos diferentes y el codón de terminación prematuro que se predice en la proteína producto del corrimiento de marco de lectura. **B y C:** Segmento parcial de la región de interés de los electroferogramas del exón 18 del gen *KAT6B* del paciente (B) y en su padre (C). El electroferograma de la madre (no mostrado) también reveló la secuencia salvaje para esta región. Marcado por una flecha vertical se muestra la consecuencia del cambio de marco de lectura en uno de los alelos. **D:** Secuencia aminoacídica predicha para el alelo mutante, que muestra la aparición de un codón de terminación prematuro. En verde, la duplicación TA a nivel de nucleótidos y la secuencia aminoacídica aberrante a nivel de proteínas. En rojo, el codón de terminación prematuro que predice una proteína trunca sin el dominio rico en Ser/Met.

Inicialmente estos síndromes eran considerados como dos entidades distintas [224] pero debido a ciertas similitudes clínicas y superposición de características, algunos autores sugieren que son parte de un mismo espectro clínico [225]. En cada extremo del espectro, hay algunas características clínicas que están asociadas con mayor frecuencia a GPS o a SBBYS. Sin embargo, las personas afectadas por trastornos relacionados con *KAT6B* con frecuencia presentan características clínicas intermedias que son una mezcla o se superponen entre estos dos síndromes. Más aún, algunas personas tienen características clínicas que no se superponen

en absoluto con ninguno de los dos síndromes [226]. Actualmente se considera que variantes en este gen dan lugar a un amplio espectro de signos y síntomas.

El paciente de nuestra cohorte presenta características clínicas compatibles con SBBYS. Las CC están presentes en ambos extremos del espectro fenotípico y aproximadamente la mitad de las personas con variantes patogénicas en *KAT6B* tienen CC que incluyen defectos septales, DAP y FO permeable. Hasta la fecha se reportaron 126 variantes patogénicas y probablemente patogénicas en la base de datos de ClinVar, de las cuales 70 se corresponden con variantes de cambio de marco de lectura, 37 son variantes sin sentido y 9 pérdidas del sitio canónico de *splicing*.

Un hallazgo interesante por SM fue la presencia de la variante (NM_000256.3):c.2176C>T en el gen *MYBPC3* en dos pacientes no relacionados, uno de los cuales presentaba una miocardiopatía no compactada (PID 351, Tabla 23) y el otro presentó TDF como parte de un fenotipo con ACM (PID 232, Tabla 23). Este último paciente, por su fenotipo, fue estudiado primero por MLPA y luego por array-CGH, pero no se encontró ninguna CNV clínicamente relevante u otra variante genética. Luego de validar la variante en *MYBPC3* por secuenciación de Sanger en los pacientes, se analizaron muestras de los padres y en ambos casos, los pacientes heredaron la variante de sus madres (Figura 30).

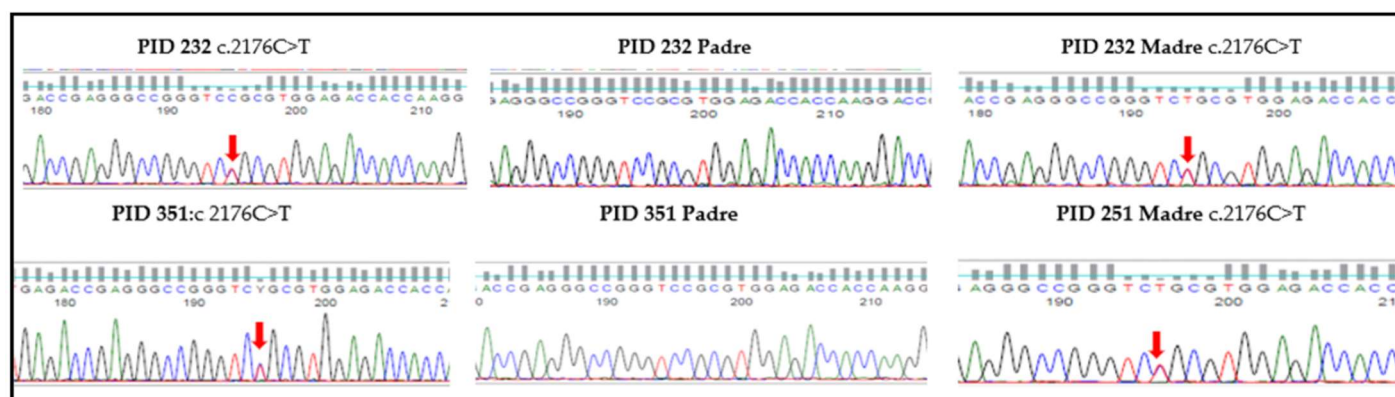


Figura 30: Electroferogramas representativos de la secuenciación de Sanger de los pacientes PID 232 (arriba) y PID 351 (abajo) y de sus padres. Las flechas rojas indican la posición de la variante.

MYBPC3 es un gen muy conocido para miocardiopatías y la variante p.(Arg726Cys), así como otras variantes en este gen, ya había sido descrita en individuos con fenotipos compatibles con el del paciente PID 351 [227–234]. Particularmente, esta variante se halló en un individuo con miocardiopatía hipertrófica (MCH) asintomática (es decir sin disnea, angina, fatiga palpitaciones

síncope, etc.) [235]. Asimismo, se encuentra en ClinVar como VUS en 4 pacientes: 1 con MCH, 1 MCH y ventrículo izquierdo no compactado y 2 pacientes en donde sólo se describe que presentan miocardiopatía. Para este gen también se describieron pacientes con fenotipos variables [212,233,234] y de destacar, se informaron variantes genéticas deletéreas en dos pacientes con TDF que además poseían otra VUS en *SOS1* y en *ARVCF*, respectivamente [21,209].

La paciente PID 329 ingresó con un cariotipo 46,XX, y si bien no presentaba una cardiopatía conotruncal, la presencia de fisura labio-alveolo palatina (FLAP) y sus dismorfias generaban sospecha de un posible SDG. Se realizó inicialmente un MLPA cuyo resultado fue negativo y se prosiguió con el análisis de la muestra por array-CGH ya que la paciente presentaba otras AC. El estudio arrojó la presencia de una delección en la región 19q13.42q13.43 (Tabla 21 y Figura 31A). Esta región contiene 53 genes que codifican proteínas, entre ellos el gen *TNNI3*. Según el equipo de ClinGen, este gen posee un score de 1 (evidencia leve) para ser clasificado como haploinsuficiente. Los casos relevados en la literatura se corresponden con pacientes que poseen variantes de pérdida de función asociadas a MCH (OMIM: 613690), miocardiopatía restrictiva (OMIM: 115210) y miocardiopatía dilatada (OMIM: 611880-recesiva, 613286-dominante) (Figura 31D). Otro genes relevantes delecionados en el intervalo, son el gen *TNNT1* asociado a miopatía nemalínica de herencia principalmente AR y con un caso familiar reportado con herencia AD [236] (Figura 31 D) y el gen *DNAAF3* que está asociado a disquinesia ciliar primaria de forma AR (OMIM:614566). Las CC asociadas a *DNAAF3* son principalmente aquellas que poseen alteraciones de lateralidad.

Esta región no se encuentra delecionada ni duplicada en bases de datos poblacionales como DGV o gnomAD. Por otro lado, se reportaron 4 casos relevantes (por tamaño y contenido génico) en bases de datos de pacientes que solapan con la región afectada en la paciente, 2 en la base de datos de ClinVar (RCV001834407.1 clasificada como probablemente patogénica y RCV000684089.1 como VUS, ambas sin fenotipo), 2 delecciones en la base de datos de DECIPHER, el caso 257434 reportado como VUS que presentaba CIA, hipotiroidismo y DI; el caso 421866 reportada como probablemente patogénica con fenotipo retraso global del desarrollo (Figura 31B). El 5to caso comparable fue reportado por Chen y colaboradores [237] en un estudio prenatal donde detectaron una delección *de novo* en la misma región 19q13.42q13.43 (Figura 31B). La paciente presentaba fisura palatina, micrognatia y retrognatia

al nacer. A los tres meses, se encontraba bien y durante el seguimiento pediátrico, no manifestó retraso psicomotor ni otras anomalías en los órganos internos.



Figura 31: Desbalance hallado por array CGH en el paciente PID 329. **A:** arriba, ideograma del cromosoma 19 abajo: resultado del array-CGH, el eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Los puntos rojos son las sondas cuya relación se encontraban por debajo del 0 y los azules aquellas que se encontraban por arriba de 0. Se representan las sondas que se encuentran en la región chr19:54568088-57330305 (GRCh37). La región delecionada en PID329 se marca con una línea roja. **B:** Regiones delecionadas en individuos descritos en publicaciones científicas o reportados en bases de datos con su fenotipo. **C:** Regiones delecionadas en individuos reportados en bases de datos. En B y C el color del intervalo describe la clasificación reportada para la variante: Rojo: Patogénica, probablemente patogénica, Gris: significado incierto; **D:** Genes OMIM propuestos en la región como posibles candidatos del fenotipo. **E:** posición del SNP reportado de susceptibilidad en paciente con fisura de labio y paladar.

Existen 6 CNVs que, si bien no son comparables en tamaño por ser más pequeñas, están contenidas en el intervalo delecionado en la paciente de nuestra cohorte y reportadas como patogénicas en las bases de datos. Una de ellas comprende a los genes *TNNI3*, *TNNT1* y

DNAAF3 en un paciente cuyo fenotipo era disquinesia ciliar. La siguiente en tamaño (RCV000767680) comprende los genes *TNNI3* y *TNNT1* con características clínicas de miopatía nemalínica 5 de herencia AR. Las otras 4 deleciones (RCV000806573, RCV000708173, RCV000817940, RCV001926033) reportadas comprenden parcialmente al gen *TNNT1* y en todos los casos los pacientes poseían miopatía nemalínica 5 AR. Compatible con estas deleciones también se reportó una paciente portadora de una deleción pequeña de 11 Kb en homocigosis que comprende los genes *TNNT1* y *TNNI3* [238]. Esta paciente presentaba miopatía nemalínica, hipotonía y miocardiopatía dilatada (Figura 31C).

Entre los genes OMIM dentro de la región en análisis y sin fenotipo asociado hasta la fecha, se encuentra el gen *IL11* (Figura 31D, barra gris). La IL-11 (Interleucina-11) es una citocina que desempeña un papel importante en la regulación del sistema inmunológico y en diversos procesos biológicos en el cuerpo. Aunque su función es diversa y compleja se describió que la señalización WNT/ β -catenina promueve la transición de fibroblasto a miofibroblasto mediada por TGF- β a través de la producción de IL-11 [239].

Finalmente, de la identificación de variantes genéticas de susceptibilidad en pacientes con fisura de labio y paladar no sindrómico [240] surge en particular un SNP, el rs8102243, NC_000019.9:g.56039473A>G, que se encuentra en la región delecionada en PID 329. Los genes más cercanos a este SNP son *TNNT1*, *TNNI3* y *DNAAF3*, todos ellos delecionados en la paciente de nuestra cohorte (Figura 31E).

La variante novel (NM_000257.4):c.671A>T (Figura 32) en el exón 8 del gen *MYH7* hallada en el paciente PID 333 por SM predice el cambio de sentido p.(Asn224Ile) en el dominio motor de miosina y 11 predictores diferentes (MetaRNN, BayesDel_addAF, DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MVP, MutationAssessor, MutationTaster y SIFT) coinciden en que es una variante deletérea.

Las variantes en este gen están ampliamente reportadas en la literatura como una causa de miocardiopatía hipertrófica/dilatada familiar (MIM 192600) y miocardiopatía no compactada (MIM 613426), por lo que es altamente probable que esta variante novel explique el fenotipo observado en este paciente (Tabla 23). Hasta la fecha se reportaron 543 variantes patogénicas de cambios de sentido en este gen, en contraste con sólo 26 benignas [210,241]. Vepsäläinen y colaboradores describen una serie de casos y analizan que la región de la cabeza de la miosina

(dominios SH3, motor y de unión a actina) contiene sitios funcionales para la contracción muscular y, por lo tanto, desempeña un papel significativo en el funcionamiento de la molécula [242]. Es por lo tanto lógico pensar que la variante en esta región ejerza un efecto perjudicial en la capacidad de la miosina para cumplir su función en la contracción muscular y, por lo tanto, conducir a una enfermedad más grave.

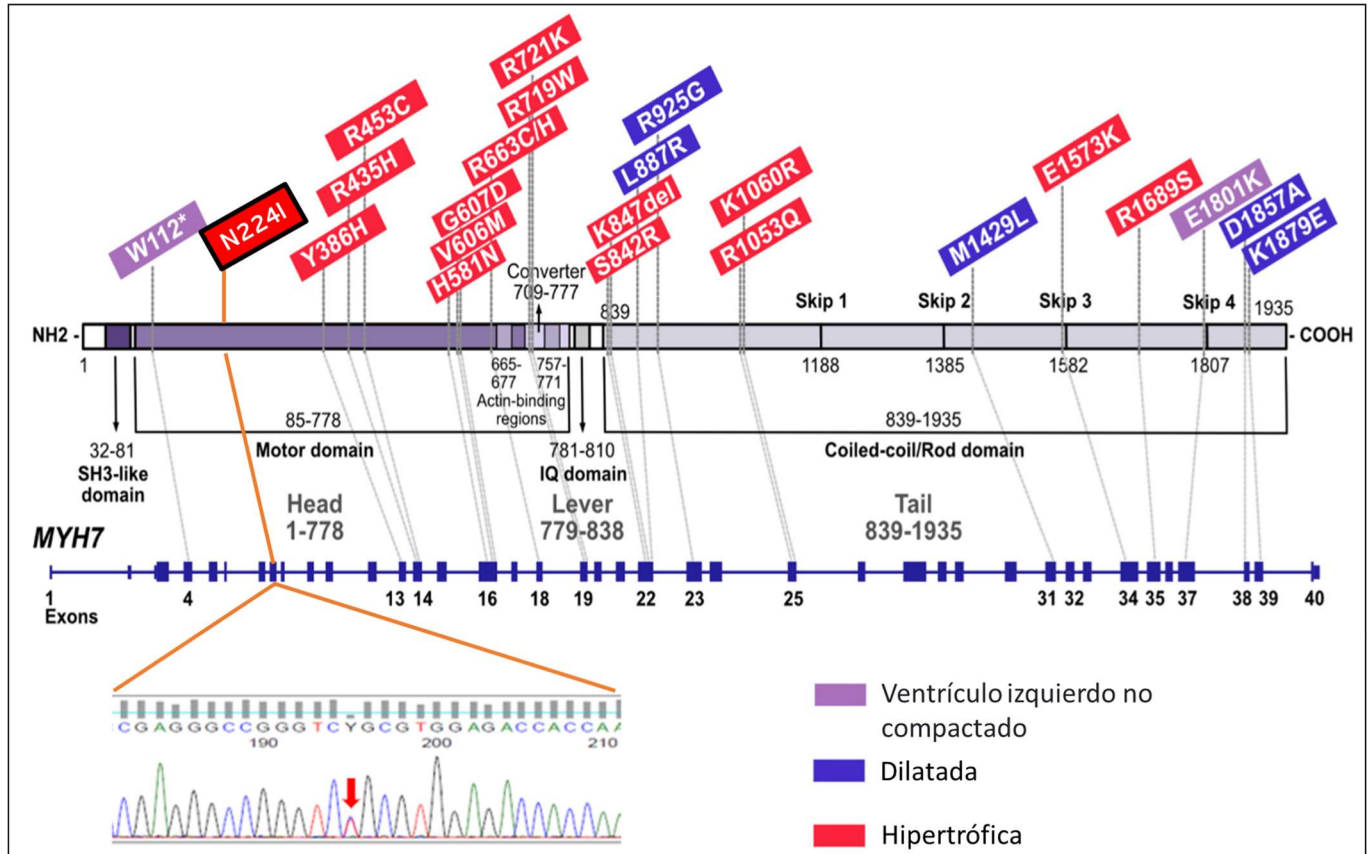


Figura 32: Variante hallada por SM en el gen *MYH7* en el paciente PID 333. Arriba se muestra un diagrama de la proteína MYH7 con los diferentes dominios SH3, motor, IQ, coiled-coil (adaptado de Vepsäläinen y colaboradores [242]). Sobre la proteína se detallan las variantes reportadas. Los diferentes colores hacen referencia al fenotipo que poseía cada paciente. Se destaca la variante novel hallada en el paciente de nuestra cohorte con un recuadro negro. Por debajo, se visualiza el diagrama del gen con sus 40 exones y el electroferograma parcial de la secuenciación de Sanger del paciente PID 333. La flecha roja indica la posición de la variante.

Para el gen *MYH7* existe una adaptación de los criterios de clasificación de variantes del ACMG. Teniendo en cuenta estos criterios particulares, la clasificación de esta variante sería probablemente patogénica [169].

El paciente PID 335 presentaba un fenotipo compatible con el síndrome de Costello (Tabla 25). Este síndrome se incluye dentro de las Rasopatías, un grupo de síndromes causados por

variantes patogénicas -principalmente de ganancia de función- en los genes implicados en la vía de señalización RAS/MAPK. La variante hallada por SM (NM_002880.3):c.770C>T en el exón 7 del gen *RAF1* (Figura 33) es una de las variantes más reportadas en la literatura para este gen y se ubica en el dominio rico en cisteínas. Los estudios experimentales demuestran que la sustitución p.(Ser257Leu) impide que el residuo 259 sea fosforilado, bloqueando la inactivación de *RAF1* [211,243].

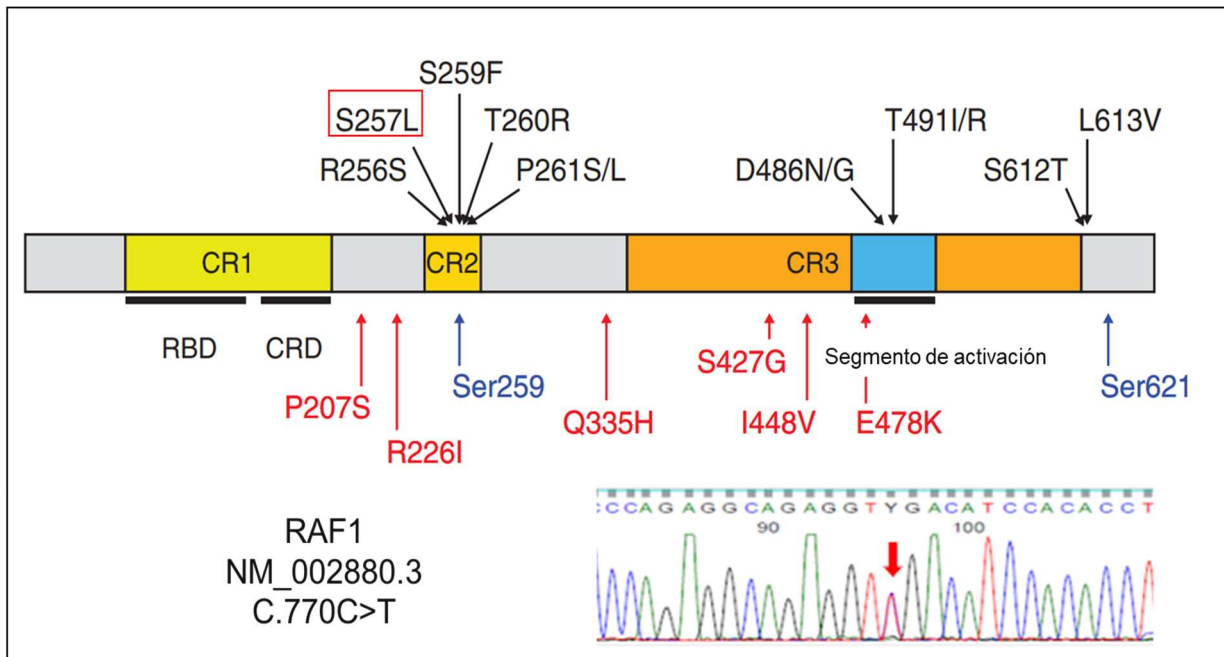


Figura 33: Variante hallada por SM en el gen *RAF1* en el paciente PID 335. Arriba se muestra el diagrama de la proteína *RAF1* con los diferentes dominios, CR: Región conservada; RBD: dominio de unión a RAS, CRD: dominio rico en cisteínas (adaptado de Pandit y colaboradores [243]). Sobre la proteína se detallan las variantes reportadas. Se destaca la variante hallada en el paciente de nuestra cohorte con un recuadro rojo. Por debajo, se visualiza el electroferograma parcial de la secuenciación de Sanger del paciente. La flecha roja indica la posición de la variante.

El paciente PID 362 no presentaba una cardiopatía conotroncal, pero la presencia de FLAP y sus dismorfias generaban sospecha de un posible SDG. Se realizó inicialmente un MLPA cuyo resultado fue negativo por lo que se prosiguió con el análisis de la muestra por array-CGH ya que el paciente presentaba también ACM. El estudio arrojó la presencia de una deleción en la región 3p21.31 (Tabla 21 y Figura 34).

Para esta región, Nevado y colaboradores resumen que las principales características de los pacientes serían la presencia de ceguera cortical, anomalías del SNC, fisura de labio y DI [173]. Se han descrito, sin embargo, pacientes con deleciones intersticiales raras que involucran la región 3p21.31 [193–196,244], cuyos desbalances son variables en tamaño, sin puntos de corte

recurrentes y con fenotipos variables. La Figura 34B y la Tabla 26 resumen el desbalance y las características observadas en la paciente de nuestra cohorte en comparación con otros pacientes de la literatura y de diferentes bases de datos para los cuales se posee información del fenotipo y de las coordenadas genómicas que abarca la delección.

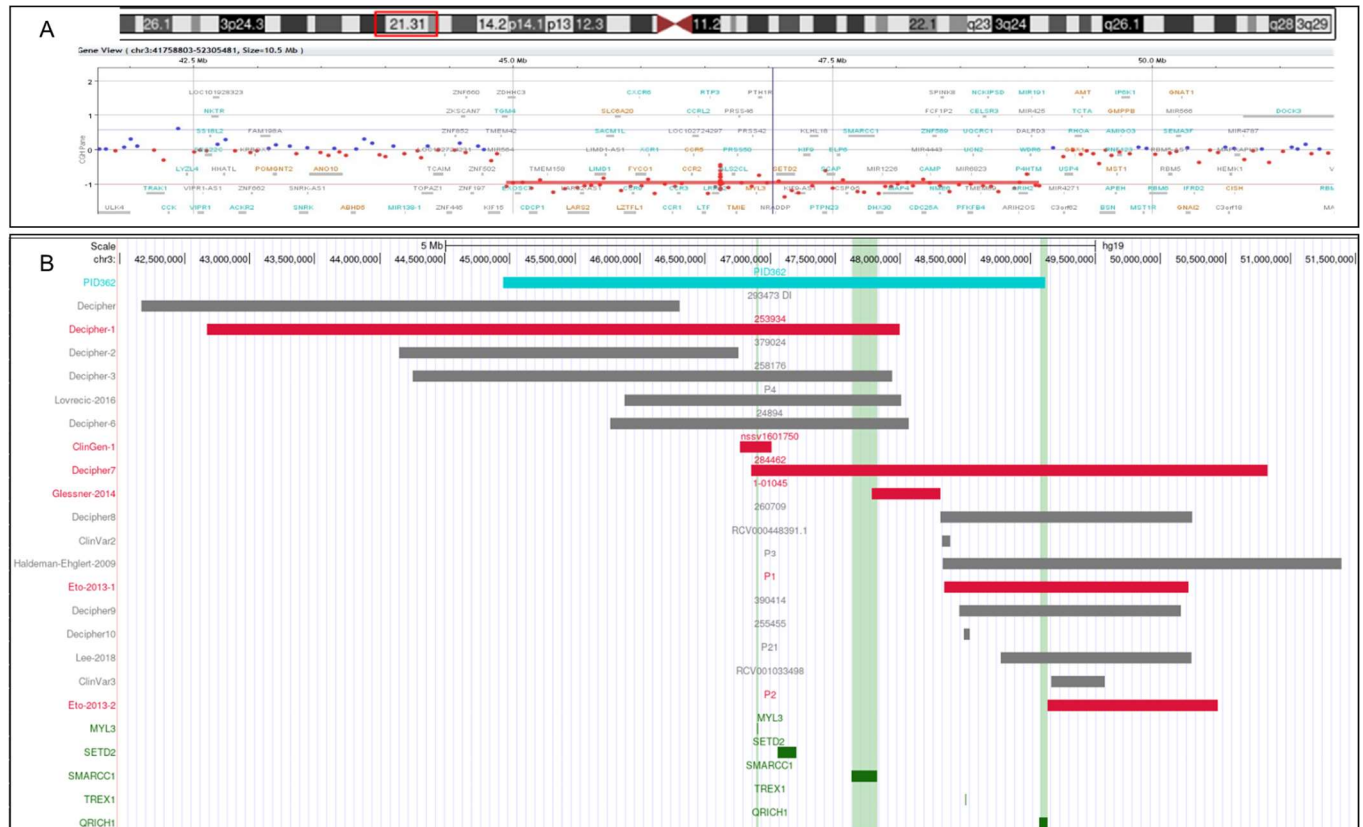


Figura 34: Desbalance hallado por array CGH en el paciente PID362. **A:** arriba, ideograma del cromosoma 3 con la región delecionada marcada en rojo (3p21.31); abajo: resultado del array-CGH, el eje Y representa el logaritmo en base 2 de la relación de fluorescencia muestra/referencia. El eje X está ordenado según la coordenada cromosómica desde el telómero del brazo corto p hasta el telómero del brazo largo q. Los puntos rojos son las sondas cuya relación se encontraban por debajo del 0 y los azules aquellas que se encontraban por arriba de 0. Se representan las sondas que se encuentran en la región chr3:41758803-52305481 (GRCh37). La región delecionada en PID 362 se marca con una línea roja. **B:** Regiones delecionadas en individuos descriptos en publicaciones científicas o reportados en bases de datos con su fenotipo. El color del intervalo describe el fenotipo cardíaco: Rojo: pacientes con CC; Gris: pacientes sin CC; Verde: genes OMIM propuestos en la región como posibles candidatos del fenotipo. En verde claro se extiende la región ocupada por los genes *MYL3*, *SMARCC1* y *QRICH1* para facilitar la comparación visual.

Tabla 26: Comparación de los fenotipos de pacientes hallados en la bibliografía con deleciones que involucran la región 3p21.31 con el fenotipo del paciente PID362

Base de datos/ publicación	Decipher	Decipher 1	Decipher 2	Decipher 3	Esta tesis	Lovrecic 2016 [196]
ID	293473	253934	379024	258176	PID 362	P4
Coordenadas Chr3 (hg19)	42167061- 46303826	42671667- 47995168	44149967- 46754514	44251270- 47936671	44948482- 49115809	45881062- 48009576
Género	M	M	M	M	M	M
Retraso del crecimiento	-	-	-	-	+	-
Baja talla	-	-	-	-	+	-
Microcefalia	-	-	+	-	-	-
Retraso en el desarrollo	+	-	+	-	+	+
Retraso en el habla	-	-	-	-	-	+
Discapacidad intelectual	-	-	-	+	-	+
Autismo	-	-	-	+	-	+
Hipotonía	-	-	-	-	-	+
Hipotonía facial	-	-	-	-	-	-
Anomalía del cuerpo calloso	-	-	-	-	-	Atrofia
Convulsiones	-	-	-	-	-	-
Reflujo gastroesofágico	-	-	-	-	+	-
RM cerebral anormal	-	-	-	-	-	+
Asimetría facial	-	-	-	-	-	-
Frente amplia	-	-	-	-	-	-
Cejas arqueadas	-	-	-	-	-	-
Hipertelorismo	-	+	-	-	+	+
Epicanto	-	-	-	-	-	-
Fisuras palpebrales	-	-	-	Descendentes	Ascendentes	Descendentes
Puente nasal aplanado	-	+	-	-	+	-
Narinas Ante vertidas	-	-	-	-	+	-
Punta nasal bulbosa	-	-	-	-	+	+
Filtrum largo	-	-	-	-	-	-
Fisura de labio	-	+	-	-	+	-
Fisura de paladar	-	+	-	-	+	-
Micrognatia	-	+	-	-	+	-
Implantación baja de orejas	-	+, anomalía del pabellón auricular	-	-	+	+
CC	-	SCIH	-	-	CIA, CIV	-
Clinodactilia del 5to dedo	-	-	-	-	+	+
Discapacidad visual	-	-	-	+	-	-
Atresia anal	-	+	-	-	-	-
Otro	-	Anomalía del sacro, hidrocefalia, hipospadias, hipoplasia renal, costillas supernumerarias, blefarofimosis	-	Hipermotropía, ptosis	-	Hipoglucemia, hidronefrosis, estenosis pieloureteral, riñón izquierdo displásico, hipotiroidismo latente

CAPÍTULO IV - RESULTADOS

Base de datos/ publicación	Decipher 6	ClinGen 1	Decipher 7	Glesser 2014 [244]	Decipher 8	ClinVar 3	Haldeman 2009 [194]	Eto 2013 [193]
ID	248943	nssv 1601750	284462	1-01045	251232	RCV000448391.1	P3	Paciente 1
Coordenadas Chr3 (hg19)	45773561- 48068283	46768104- 47009805	46852723- 50824570	47780965- 48309270	48311179- 50244657	48322672- 48381992	48326433- 51389570	48335484- 50215391
Género	F	-	F	-	F	-	F	F
Retraso del crecimiento	-	-	-	-	-	-	+	-
Baja talla	-	-	-	-	-	-	+	-
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-
Retraso en el desarrollo	-	-	-	-	-	-	+	+
Retraso en el habla	+	-	-	-	-	-	+	+
Discapacidad intelectual	+	-	-	-	+	-	-	-
Autismo	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotonía	+	-	-	-	-	-	+	+
Hipotonía facial	-	-	-	-	-	-	+	+
Anomalía del cuerpo caloso	-	-	-	-	-	-	Agenesia parcial	-
Convulsiones	-	-	-	-	-	+	+	-
Reflujo gastroesofágico	-	-	-	-	-	-	+	-
RM cerebral anormal	-	-	-	-	-	-	+	+
Asimetría facial	-	-	-	-	+	-	-	+
Frente amplia	-	-	-	-	-	-	+	+
Cejas arqueadas	-	-	-	-	-	-	+	+
Hipertelorismo	-	-	+	-	-	-	+	+
Epicanto	-	-	-	-	-	-	+	+
Fisuras palpebrales	-	-	Descendentes	-	-	-	Ascendentes	-
Puente nasal aplanado	-	-	-	-	-	-	-	+
Narinas Ante vertidas	-	-	-	-	-	-	-	+
Punta nasal bulbosa	-	-	-	-	-	-	+	+
Filtrum largo	-	-	-	-	-	-	+	+
Fisura de labio	-	-	-	-	-	-	+	-
Fisura de paladar	-	-	-	-	-, paladar alto	-	-	-
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	+	+
Implantación baja de orejas	-	-	+, orejas posteriores y rotadas	-	-	-	-	+
CC	-	+	TGV, CIA	SCHI	-	-	-	CIV
Clinodactilia del 5to dedo	+	-	-	-	-	-	-	-
Discapacidad visual	-	-	+	-	-	-	+	-
Atresia anal	-	-	+	-	-	-	-	-
Otro	-	-	Ptosis	-	Macroglosia	-	Movimiento anormal de ojos, Pale fundi, electroencefalo- grama anormal	Marcha atáxica, sinofris

CAPÍTULO IV - RESULTADOS

Base de datos/ publicación	Decipher 9	Lee 2018 [195]	Decipher 10	Eto 2013 [193]	ClinVar 2	Total
ID	390414	P21	255455	paciente 2	RCV001033498	N/Total (%)
Coordenadas Chr3 (hg19)	48456307- 50156383	48770345- 50237479	48488706- 48536200	49129830- 50440305	49158649- 49570642	
Género	F	-	M	F	-	
Retraso del crecimiento	+	-	-	+	-	4/19(21%)
Baja talla	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Microcefalia	-	-	+	-	-	2/19(10%)
Retraso en el desarrollo	+	+	-	+	-	9/19(47%)
Retraso en el habla	-	-	-	+	-	5/19(26%)
Discapacidad intelectual	-	-	+	+	-	6/19(31%)
Autismo	-	-	+	-	-	3/19(16%)
Hipotonía	-	-	-	+	-	5/19(26%)
Hipotonía facial	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Anomalía del cuerpo calloso	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Convulsiones	-	-	-	+	-	3/19(16%)
Reflujo gastroesofágico	-	-	-	-	-	2/19(10%)
RM cerebral anormal	-	-	-	+	+	4/19(21%)
Asimetría facial	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Frente amplia	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Cejas arqueadas	-	-	-	+	-	3/19(16%)
Hipertelorismo	-	-	-	+	-	7/19(37%)
Epicanto	-	-	-	+	-	3/19(16%)
Fisuras palpebrales	-	-	-	Ascendentes	-	-
Puente nasal aplanado	-	-	-	-	-	3/19(16%)
Narinas Ante vertidas	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Punta nasal bulbosa	-	-	-	-	-	4/19(21%)
Filtrum largo	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Fisura de labio	-	-	-	-	-	3/19(16%)
Fisura de paladar	-	-	-	+	-	3/19(16%)
Micrognatia	-	-	-	+	-	5/19(26%)
Implantación baja de orejas	-	-	-	+	-	6/19(31%)
CC	-	-	-	CIA, DAP	-	7/19(37%)
Clinodactilia del 5to dedo	-	-	-	-	-	3/19(16%)
Discapacidad visual	-	-	-	-	+	4/19(21%)
Atresia anal	-	-	-	-	-	2/19(10%)
Otro	-	Dismorfias faciales, <i>midgut</i> <i>volvulus</i> , Regiones edematosas recurrentes en el pie, la mano y el labio	-	Hipocalcemia, otitis media aguda recurrente, deficiencia de la hormona del crecimiento	Distrofia muscular de cinturas- dístroglicanopatía	

ID: identificador del individuo en base de dato o publicación, M: masculino, F: femenino. RM: Resonancia Magnética, CC: cardiopatía congénita, +: característica descrita, - : característica no descrita, SCHI: Síndrome del Corazón Izquierdo Hipoplásico, CIA: Comunicación interauricular, CIV: Comunicación interventricular, TGV: Trasposición de grandes vasos.

Los datos actuales apoyan la idea de que los pacientes presentan un amplio espectro de alteraciones y manifestaciones clínicas respecto de las reportadas en una primera instancia por Nevado y colaboradores [173]. Se han descrito más de 26 pacientes portadores de deleciones intersticiales raras que involucran la región 3p21.31. En particular, se destacan 6 pacientes de bibliografía de los cuales 2 presentaron deleciones dentro del rango de la deleción del paciente de nuestra cohorte [196,244], en otros 3 la región delecionada se superpone parcialmente y 1 presentó una deleción adyacente [193–195] (Figura 34B). En la base de datos DECIPHER [245] existen 12 reportes de individuos con deleciones de diferentes tamaños y puntos de corte en 3p21.31, pero sólo para 8 se describen las características clínicas (Figura 34B y Tabla 26). En la base de datos de ClinGen hay 2 individuos publicados con desbalances en la región: uno de ellos presenta una deleción en el rango de deleción del paciente descrito en esta tesis para el cual se describe la clínica que presenta y el otro se superpone con la región afectada pero no está clínicamente descrito.

Entre los genes presentes en la región el único curado como haploinsuficiente por el grupo de expertos de ClinGen está el *SETD2* (ISCA-13427) (Figura 34B), que codifica para la principal metiltransferasa de histona que cataliza la trimetilación de H3K36. Variantes en *SETD2* se asocian al síndrome de Luscan-Lumish (OMIM:616831), una afección que se caracteriza por trastornos del neurodesarrollo y crecimiento excesivo, si bien se describieron varios casos de variantes con aparente pérdida de función (LOF) en este gen en individuos que no presentaban crecimiento excesivo, pero sí trastornos del neurodesarrollo. Otras características presentes en pacientes con variantes LOF en *SETD2*, son macrocefalia, DI, trastorno del espectro autista (TEA), retraso del habla, convulsiones, hipermovilidad articular, hirsutismo y la presencia de nevos [246–254]. Este gen sin embargo no explica la variabilidad fenotípica detectada en los pacientes con desbalances en la región. De hecho, Eto y colaboradores postulan que *“Debido a que la constelación de características es bastante única, las manifestaciones clínicas de los pacientes con microdeleciones de 3p21.31 serían clínicamente reconocibles como un síndrome de deleción de genes contiguos”* [193].

Otro gen presente en la región es *TREX1* (Figura 34B) que codifica una proteína nuclear con actividad exonucleasa 3' -5'. Esta proteína desempeñaría un papel en la reparación del ADN y en la corrección de errores de la ADN polimerasa. Las mutaciones en este gen están relacionadas con el síndrome de Aicardi-Goutieres con herencia AR (OMIM:225750). La aparición neonatal está asociada a variantes de cambio de sentido y se manifiesta como

microcefalia progresiva, espasticidad, postura distónica y profundo retraso psicomotor. A menudo los pacientes fallecen durante la primera infancia. Asimismo, este gen se asocia con susceptibilidad a lupus eritematoso con herencia AD (OMIM:152700), vasculopatía retiniana con leucoencefalopatía cerebral (RVCL) y manifestaciones sistémicas (OMIM: 192315) y otras enfermedades del sistema inmunológico [255].

La RVCL es un trastorno genético raro con un patrón de herencia autosómico dominante que se caracteriza por una endoteliosis microvascular que afecta al cerebro, la retina, el riñón y otros microvasos sistémicos. Variantes que alteran el marco de lectura en la región del carboxilo terminal de la proteína contribuyen a la RVCL. La proteína TREX1 mutada mantiene la actividad de exonucleasa, pero existiría una localización aberrante de la proteína mutada debido a una translocación defectuosa al núcleo en respuesta al daño oxidativo del ADN que se asociaría con la endoteliosis microvascular sistémica que presentan los pacientes con RVCL. Si bien la haploinsuficiencia de *TREX1* aún no fue evaluada por el grupo de especialistas de ClinGen, existe la posibilidad que la delección revele la presencia de variantes en el otro alelo aumentando la variabilidad del fenotipo de la región.

Respecto de los posibles genes candidatos en esta región que podrían estar implicados en la patogénesis de la CC, del análisis realizado a partir del solapamiento de deleciones de pacientes con CC, proponemos 3 genes, el *MYL3*, el *SMARCC1* y el *QRICH1* (Figura 34B), como posibles genes candidatos que podrían tener implicancias con este fenotipo. A continuación, se enumeran las evidencias científicas para esta propuesta.

MYL3: En la Figura 34B y la Tabla 26 se detalla que este se encuentra delecionado en 7 pacientes, de los cuales 4 presentan cardiopatías (Decipher 7 y 1, ClinGen 1 y el paciente PID 362 de nuestra cohorte). En particular, el paciente ClinGen 1 sólo posee delecionado *MYL3*. Este gen codifica la cadena liviana 3 de la miosina, que junto con *MYL2* se postula que influyen en la eficiencia mecánica del ciclo de puentes cruzados de miosina y la velocidad de contracción [256]. Además, estas 2 proteínas regularían la producción de energía a través de un mecanismo dependiente del calcio [256]. Se reportaron variantes en *MYL3* como causales de MCH de forma AD y AR (OMIM: 608751), miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MONDO:0016587) y miocardiopatía dilatada (MONDO:0005021), ambas de forma AD. El grupo de expertos de ClinGen en 2015 describe que la principal causa de la patogénesis en *MYL3* sería la presencia de variantes puntuales de cambio de sentido al afectar la interacción con otros componentes del sarcómero que respalde su haploinsuficiencia (ClinGen: ISCA-4377 curado en

2015, [257–261]. Más recientemente, Osborn y colaboradores [262] demuestran que variantes LOF en homocigosis en *MYL3* pueden ser la causa de una miocardiopatía AR. Por su parte, en ClinVar a la fecha se reportaron 18 variantes LOF (cambio del marco de lectura, terminadores prematuros y en un sitio canónico de *splicing*) que fueron clasificadas como variantes de significado incierto en pacientes con MCH.

SMARCC1: este gen se encuentra deletado en 7 pacientes de los cuales 4 presentan cardiopatías (Glessner-2014, Decipher 1 y 7 y PID362, Tabla 26 y la Figura 34B). En particular. El paciente descrito por Glessner y colaboradores [244] posee deletados 5 genes OMIM completos (*DHX30* OMIM:616423, *CDC25A* OMIM:116947, *CAMP* OMIM:60047, *ZNF589* OMIM:616702) y 1 parcialmente deletado (*SMARCC1* OMIM:601732). De estos genes, sólo a *SMARCC1* está asociado a CC hasta el momento. Homsy y colaboradores [128], identificaron por SM una variante *de novo* de cambio de sentido en *SMARCC1* en un paciente con CC. Un estudio realizado por Scot y colaboradores [263] demuestra que pequeñas alteraciones en la distribución subcelular de *SMARCC1*, causadas por el transporte defectuoso de *BBS6* (OMIM: 604896), conducen a defectos cardíacos congénitos en pacientes con síndrome de McKusick-Kaufman. Por su parte, Gonzalez-Teran y colaboradores [264] hipotetizan que los determinantes genéticos de las CC pueden encontrarse en los interactomas de proteínas como *GATA4* y *TBX5*, dos factores de transcripción muy relacionados a CC. Luego de integrar datos experimentales con resultados de datos genéticos del Consorcio Genómico Cardíaco Pediátrico, hallaron un enriquecimiento de variantes *de novo* en las proteínas que interactúan con *GATA4* o *TBX5*. En particular, 3 modificadores de la cromatina, *BRD4*, *GLYR1* y *SMARCC1*, ocuparon los primeros lugares entre las proteínas del interactoma con roles desconocidos en las CC. Estos genes candidatos de CC se detectaron como interactores de *GATA4*, y fueron validados mediante co-inmunoprecipitación. Ellos sugirieron que, aunque la contribución específica de *SMARCC1* a las CC aún es incierta, su proteína *SMARCC1* (también llamada *BAF155*), es un componente del complejo *BAF* que orchestra muchos aspectos del desarrollo cardíaco [264]. Si bien el grupo de expertos de ClinGen aún no evaluó su haploinsuficiencia, existen publicaciones que demuestran letalidad embrionaria temprana en ratones heterocigotas para *Smarcc1* [265,266].

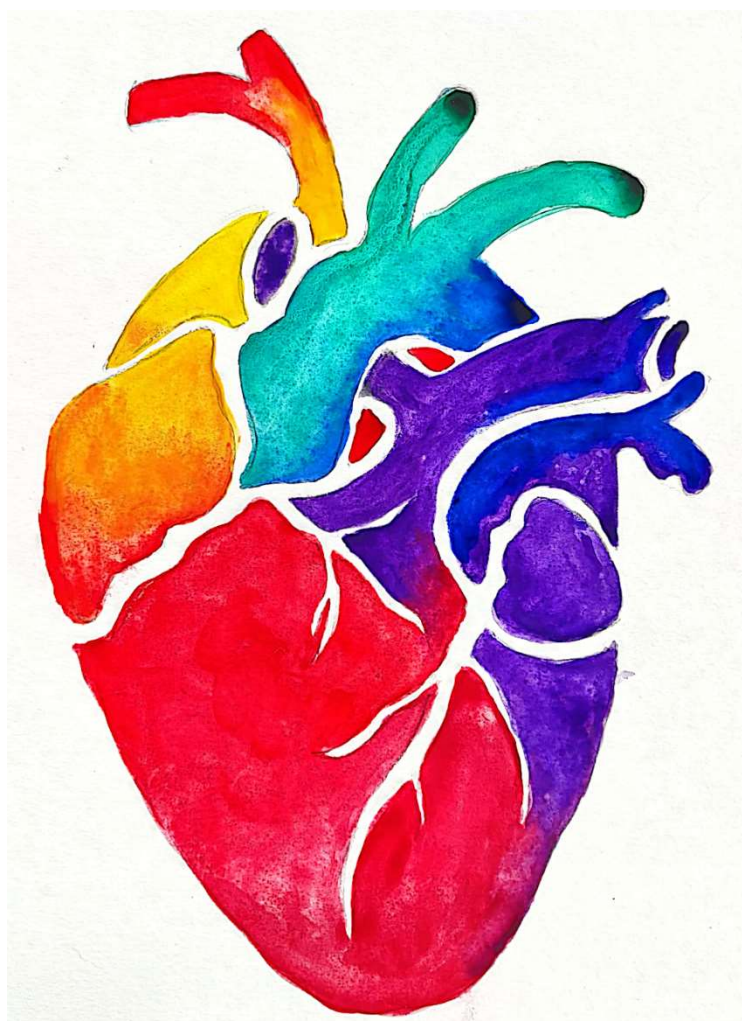
QRICH1: Este gen se encuentra deletado en 8 pacientes de los cuales 4 presentan cardiopatías (Eto-2013 [193] pacientes 1 y 2, Decipher 7 y PID 362, Figura 34B y la Tabla 26). Si bien el gen *QRICH1* no está curado como haploinsuficiente, se describe con herencia autosómica dominante donde variantes puntuales de pérdida de función (LOF) son responsables

del Síndrome de Ververi-Brady (OMIM# 617982). Las principales características de este síndrome son retraso en el habla, retraso motor moderado, dificultades de aprendizaje/ligera discapacidad intelectual, autismo, microcefalia leve, baja estatura y déficits notables en el comportamiento social [267–269]. Estas características son compatibles con las que presenta el paciente de nuestra cohorte, aunque no describen que posean cardiopatía. Curry y colaboradores [270] describen un paciente con una variante en un sitio de *splicing* del gen *QRICH1* (NM_017730.3 c.1896-2A>G) predicha como de LOF. El paciente presentaba CIA, micrognatia, leve DI, reflujo gastroesofágico y dismorfias. A favor de su implicancia en las CC, se describieron variantes de pérdida de función en este gen en las bases de datos de pacientes. Hasta la fecha se depositaron en la base de datos de Decipher 11 variantes en este gen. Si bien, sólo 8 pacientes poseen descripción de fenotipo, el paciente 287612 presenta TGV entre otras características.

Finalmente, en la Figura 34B y la Tabla 26 se describen 3 pacientes con cardiopatías, pero cuyas deleciones no se solapan entre sí y que por lo tanto no comparten entre ellos genes candidatos. Sin embargo, el paciente 2 presentado por Eto y colaboradores [193] posee una deleción que involucra *QRICH1*, el paciente presentado por Glessner y colaboradores [244] involucra al gen *SMARCC1* y el paciente reportado en la base de datos de ClinGen-1 posee deleccionado el gen *MYL3*. Asimismo, es interesante destacar que sólo PID 362 y Decipher 7 tienen deleccionados los 3 genes candidatos. Decipher 7 comparte la TGV con la paciente Decipher 287612 que posee una variante puntual en *QRICH1* y la CIA con la paciente PID 362 de nuestra cohorte y con la paciente presentada por Curry y colaboradores que posee una variante LOF [270].

-CAPÍTULO V-

DISCUSIÓN



Esta tesis se desarrolla en el contexto de dos proyectos de investigación independientes de relevancia para la salud pública relacionadas con las causas genéticas asociadas a CC. En el primer grupo de pacientes que estudiamos, propusimos una investigación que tenía alcance federal con el objetivo de incluir pacientes de diferentes regiones del país. Nuestra intención fue que este proyecto se concrete dejando establecida una red de derivación que permita a los pacientes acceder a evaluaciones especializadas después de que finalice el estudio.

En una segunda etapa, asumimos el objetivo de conectar principalmente las maternidades ubicadas en la región VI de la provincia de Buenos Aires y la maternidad Sardá de CABA con los laboratorios del Hospital El Cruce y del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM). La región VI de la provincia de Buenos Aires presenta el mayor número de nacimientos en todo el país, y la maternidad Sardá es la principal maternidad del ámbito público de CABA. Esta iniciativa tuvo como propósito principal aumentar la conciencia sobre las AC en general, y las ACM y CC en particular, y destacar la importancia de su diagnóstico temprano en el contexto de la atención perinatal. Teniendo en cuenta los datos aportados por la RENAC, esperábamos reclutar aproximadamente 180 muestras de pacientes con ACM y CC aisladas cada año. Finalmente, se reclutaron un total de 380 muestras en el transcurso de los cuatro años del proyecto, de las cuales 254 se utilizaron específicamente para la presente tesis.

Como se mencionara precedentemente, las CC constituyen las AC más frecuentes y una de las principales causas de mortalidad perinatal. De acuerdo con los datos de la RENAC (comunicación personal -[271]), la prevalencia de nacidos con CC en nuestro país en el período 2009-2018 fue de 4.92 /1000 nacimientos y la prevalencia al nacimiento de CC severas de 1.15/1000.

Un gran número de pacientes con CC no presentan una etiología conocida. Sin embargo, se describió que alrededor del 2.7% de los pacientes poseen antecedentes familiares (~2.7%) [61] ya sean casos sindrómicos o con CC aisladas. Estas observaciones son consistentes con la contribución de factores genéticos en el desarrollo de la patología [107].

Entre las causas genéticas identificables de CC, se observan anomalías cromosómicas en el 8% y el 13% de los pacientes [50,52,70]. Asimismo, entre el 13 y el 18% de los pacientes que presentan CC conotruncal (20 al 30 % de las CC al nacimiento y primera causa de cianosis de origen cardíaco durante el primer año de vida), presentan una delección en la región 22q11 [70,118–120,272].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la primera parte del proyecto de tesis, se incluyeron pacientes que presentaban CC conotroncales derivados de 4 regiones de todo el país (Grupo A) para quienes se analizó la posible presencia de anomalías cromosómicas mediante técnicas de citogenética clásica, se investigó la presencia de la delección 22q11 -la CNV de presentación más común- y se estudiaron otros posibles desbalances reportados en la literatura. Avanzando con el trabajo de tesis, ampliamos la inclusión a pacientes que presentaban todo tipo de CC derivados de CABA, La Plata y la región sanitaria VI de provincia de Buenos Aires (Grupo B), implementamos la búsqueda de CNVs en todo el genoma (luego de analizar la del 22q11 en CC conotroncales) mediante la técnica de array-CGH en un grupo de pacientes con al menos otra anomalía mayor y analizamos la presencia de variantes de secuencia en un conjunto de genes implicados en CC mediante técnicas de SM en un grupo seleccionado de pacientes.

En el grupo A no se detectaron anomalías cromosómicas en los pacientes estudiados. La delección en 22q11 fue analizada tanto por FISH como por MLPA en este grupo, y en ambos casos los resultados fueron concordantes. Sin embargo, el MLPA brindó información adicional al FISH al hallar delecciones no tan frecuentes en otras regiones del genoma. Es importante mencionar, que en aquellos casos en que fracasó el cultivo necesario para la realización de cariotipos y FISH, el MLPA fue exitoso. En conjunto, estos resultados indican la ventaja del uso de MLPA, que además es más rápido y sencillo de realizar.

La proporción de pacientes con CCC con desbalances en la región 22q11, fue similar en ambos grupos analizados (20.8% grupo A, 21.2% grupo B) y similares a lo reportado por otros autores [119,120,272,273]. Otros estudios, sin embargo, reportan frecuencias más bajas que oscilan entre 2.5%-6.8% [274–276]. Estas diferencias podrían deberse a la proporción de las distintas CCC estudiadas en cada caso. Es sabido que la frecuencia de la delección es mayor en pacientes con TDF o con TAP que en pacientes que poseen TGV o DSVD [50]. Asimismo, se describió que pacientes de origen hispánico poseen mayor frecuencia de esta delección que otros grupos étnicos [277].

Todos los pacientes que presentaron la delección 22q11 en el grupo A tenían la delección típica de 3 Mb. En el grupo B se hallaron también pacientes con delecciones más cortas y con duplicaciones, si bien en frecuencias mucho menores que la de 3 Mb, cuya frecuencia en otras poblaciones es de aproximadamente 97% entre los pacientes que poseen delección en esta región [50,278]. Por otro lado, en el grupo A se hallaron desbalances en el brazo corto del cromosoma 17 (17p), en concordancia con trabajos reportados para otras poblaciones [279,280].

Sin embargo, estos desbalances no se hallaron en el grupo B. Una posible explicación es que en el grupo A se incluyeron pacientes de otras regiones del país y que eso pudiera representar una diversidad genética mayor.

En nuestro estudio, se encontraron desbalances en la región 22q11 en el 50% (Grupo A) y 55% (Grupo B) de los pacientes que presentaron IAA, en el 38% (grupo A) y 40% (grupo B) de los pacientes con CIV+AP, en el 33% (grupo A) y 42% (grupo B) de los pacientes con TAP y en el 14% (grupo A) y 24% (grupo B) de los pacientes con TDF, mientras que no se la halló en ningún paciente con TGV o DSVD en ninguno de los dos grupos. En una revisión realizada por Goldmuntz en 2020 [281], se describen proporciones de deleciones similares a las detectadas en este trabajo en los diferentes grupo de cardiopatías analizadas (50-89% IAA, 34-41% TAP, 8-35% TDF y <1% TGV. En ese trabajo no se estudiaron pacientes con AP+CIV, sino pacientes con CIV subaórtica sin AP. El porcentaje de pacientes con Del22q11 fue mucho menor (7%) para estos pacientes que para los estudiados en esta tesis que presentaban AP.

No hallamos que la Del22q11 se asocie diferencialmente si la cardiopatía es simple o compleja en ninguno de los dos grupos. La frecuencia de desbalances en la región 22q11 fue mayor en aquellos pacientes con CCC que presentaban al menos otra anomalía mayor extracardíaca (31% vs.18% grupo A, 26% vs.19% Grupo B). Sin embargo, es importante destacar que el 50% de los pacientes que presentaron desbalances en 22q11 en el grupo A y el 72% en el grupo B, la CC era la única anomalía mayor que presentaban los pacientes. Estas observaciones refuerzan la importancia de este estudio en pacientes con CCC aisladas ya que en la mayoría de estos niños no se hubiera sospechado la presencia de la deleción a través de un fenotipo sugerente de un síndrome. El diagnóstico temprano contribuye a la prevención y a un mejor manejo de las posibles complicaciones posteriores, como ser la inmunodeficiencia, la hipocalcemia, el retraso del desarrollo y del habla, trastornos del comportamiento y enfermedades psiquiátricas que se observan con frecuencia en el síndrome de Del22q11 [282]. Estos signos clínicos que no son evidentes al nacimiento, por lo que nuestros resultados son consistentes con el hallazgo de un alto porcentaje de CCC aisladas entre los pacientes con la deleción, en donde la mayoría de los pacientes fueron derivados en periodo neonatal (grupo B).

Los pacientes con SDG enfrentan un riesgo aumentado de enfrentar complicaciones tanto durante como después de una cirugía cardíaca [283]. Esta realidad subraya la importancia crítica de identificar la presencia de este síndrome en pacientes con cardiopatías. Cuando se tiene conocimiento de que un paciente tiene SDG, el equipo médico puede tomar medidas proactivas

para mitigar los riesgos asociados. Esto implica una preparación meticulosa y una planificación más detallada antes de la cirugía, considerando las peculiaridades que este síndrome puede aportar [283]. La información sobre la presencia de SDG permite que se implementen medidas de prevención específicas, pudiendo involucrar estrategias de manejo de infecciones, monitoreo más riguroso de factores como la función inmunológica, y una atención más focalizada en las necesidades individuales del paciente [283]. En resumen, saber si un paciente tiene SDG no solo permite una mejor preparación para la cirugía, sino que también facilita una atención más personalizada y atenta a los riesgos particulares asociados, permite una mejora en los resultados y en la seguridad del paciente en el proceso de tratamiento cardíaco. En conjunto, estas observaciones refuerzan la necesidad de realizar el estudio molecular en niños con CCC al nacimiento.

En el grupo B se estudiaron pacientes que poseían CC no conotruncal, pero con sospecha del SDG. De un total de 15 pacientes que poseían CC aisladas, 4 presentaron desbalances en la región. Cada uno de ellos presentaba una CC que ya había sido descripta asociada al SDG: estenosis de rama pulmonar, EP con CIA, CIV y DAP, anillo vascular y CIV con miocardiopatía dilatada [358]. Por su parte, ninguno de los 9 pacientes analizados con CC no conotruncal y otra anomalía mayor presentó desbalances en esta región ni en las otras regiones incluidas en el kit de MLPA utilizado.

El análisis por MLPA en combinación con la secuenciación de Sanger de la región evidenció una delección parcial intersticial en el gen *TBX1* que comprende al menos el exón 7 en 1 paciente - PID 126- que presentaba además una TGV y una CIV. Existe mucha evidencia acumulada que respalda el papel crucial del gen *TBX1* en la génesis del SDG/síndrome velocardiofacial, especialmente en lo que respecta a los defectos cardíacos. Entre las variantes reportadas a la fecha se incluyen cambios de marco de lectura que llevan a la expresión de proteínas alteradas [284–286], una delección de 0.8 Kb y una delección que afecta los exones 2 a 7 de este gen [287–288]. El puntaje asignado por el panel de expertos de ClinGen a la haploinsuficiencia del *TBX1* es de 2, valor indicativo que existe evidencia emergente que la respalda. Por lo tanto, el hallazgo de la delección en el paciente de nuestra cohorte contribuye significativamente a sumar evidencia que sustenta la hipótesis de haploinsuficiencia en el gen.

Por la técnica de MLPA también detectamos una delección de al menos 1 Mb en el cromosoma 17 en el paciente CH010. Esta anomalía es conocida como síndrome de microdelección 17p13.3 distal (ORPHA: 261257) o síndrome de Miller-Dieker. Burno y colaboradores [289] revisaron

diferentes pacientes con desbalances en la región 17p13 descritos en la literatura hasta el 2010 y sugirieron que deleciones terminales cortas que incluyen a los genes *YWHAE* o *CRK* provocan un fenotipo variable que no necesariamente presenta la lisencefalia característica del síndrome, mientras que aquellas deleciones más largas, que incluyen al gen *PAFAH1B1*, si la presentaban. Si bien la técnica de MLPA no permite detectar los puntos de corte con precisión, el hallazgo de la deleción en el paciente de nuestra cohorte sería compatible con lo sugerido por los autores del trabajo ya que el fenotipo del paciente era menos severo sin la presencia de lisencefalia y la deleción, *a priori*, no era visible citogeneticamente.

El desbalance en 17p13 se describió por primera vez en 1988 en un paciente con una DSVD [290]. Otra publicación más reciente, la reportó en un paciente con AP+CIV [291] y los autores proponen que el gen *NXN* -que mapea en la región de la deleción- sería el causal del fenotipo cardíaco ya que la pérdida de este gen causa CC en ratones. Además, se describió que este gen se expresa en el corazón humano y si bien se predice su haploinsuficiencia, al día de hoy no está curado como tal [292]. Por otro lado, el papel de *NXN* en la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina a través de la regulación de la proteína Dishevelled y su rol *a posteriori* en la señalización del segundo campo cardíaco, sugiere también una a posible participación de *NXN* en el desarrollo cardíaco. Otras evidencias a favor de la causalidad de este gen en el fenotipo cardíaco son las publicaciones de Silversides y colaboradores [293] que describen un paciente que presentaba una pequeña deleción de 544 Kb que solapa al gen *NXN* con la misma cardiopatía (TDF) que el paciente de nuestra cohorte, y la de Chen y colaboradores [294] que describen una paciente con TDF como parte de un fenotipo muy complejo compatible con el síndrome de Miller-Dieker que presentaba una deleción terminal citogeneticamente visible en 17p13.2.

La importancia de la incorporación del análisis de CNVs mediante la tecnología de array-CGH en el diagnóstico de pacientes con ACM es un elemento crucial en la evolución de la medicina genética. La evidencia científica respalda su eficacia y eficiencia en la detección de variaciones genéticas significativas que pueden ser pasadas por alto con otras metodologías más tradicionales. y se ha convertido en una herramienta valiosa para alcanzar diagnósticos más precisos en un grupo de pacientes que, de otra manera, podrían quedar sin respuestas claras sobre la causa de sus anomalías genéticas.

Es fundamental considerar que la detección temprana y precisa de las causas subyacentes de las ACM no solo tiene implicancias en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes, sino que

también puede proporcionar información valiosa para asesorar a las familias en términos de pronóstico y planificación de cuidados. Mientras que en los países centrales este análisis se ha convertido en el primer filtro en la detección de alteraciones cromosómicas [154], en nuestra región, debido a consideraciones económicas y de recursos, se continúa realizando el cariotipo como paso inicial.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, y considerando que los costos son un factor determinante, se implementó un enfoque selectivo y criterioso de tal manera de llevar a cabo el análisis de CNVs mediante array-CGH analizando aquellos pacientes que *a priori* estimamos se pudieran ver más beneficiados con este análisis. Para tal fin, incluimos pacientes que presentaban al menos dos anomalías mayores y para los cuales se disponía de una cantidad y calidad adecuada de ADN para garantizar resultados óptimos y oportunos. A pesar de que el análisis de CNVs se realizó en una etapa posterior al cariotipo, su inclusión en nuestro algoritmo representó un avance significativo en la identificación de alteraciones genéticas. Esta estrategia nos permitió maximizar la eficiencia, optimizando los recursos disponibles. En este trabajo de tesis, y gracias al tamizaje previo de la exclusión fenotípica de los pacientes con trisomías 21 así como al análisis de MLPA realizado con anterioridad que permitió detectar deleciones en 22q11 y 17p13.3, se logró un uso más eficiente y racional de los recursos. Los resultados presentados subrayan los beneficios del análisis de CNVs por array en la población de pacientes con ACM en Argentina, y fortalecen la necesidad de considerar su implementación más generalizada en nuestro país.

Nuestros resultados indicaron que el 20.9% de las muestras analizadas mediante array-CGH presentaban CNVs patogénicas o probablemente patogénicas. Estos resultados son compatibles con otros trabajos de la literatura [295–297], en donde se describe desbalances patogénicos que oscilan entre el 4% y el 30 % de los casos analizado. De cualquier manera, se debe tener en cuenta que los algoritmos de trabajo y de inclusión de pacientes, no necesariamente son los mismos. Thienpont y colaboradores [295] describen desequilibrios patogénicos en el 30% de los casos con CC, si bien, entre los casos detectados se encontraban deleciones y duplicaciones 22q11. En su revisión, Breckpot y colaboradores [296] reportan una detección de CNVs mediante array-CGH en el 19% de los pacientes con CC sindrómicas (entre las cuales estaban incluidas deleciones en 22q11) y un 3% en no sindrómicas. Recientemente, en la revisión realizada sobre 525 neonatos, Findley y colaboradores [297] reportan un rendimiento diagnóstico de los

pacientes analizados mediante array-CGH que oscila entre el 4% y el 28%. Sin embargo, entre los neonatos se detectaron trisomías 21, deleciones 22q11 y 17p13.3.

Entre las muestras analizadas, no se identificaron pacientes que compartieran la misma CNV. Estos resultados son consistentes con el hecho que está bien documentada una variabilidad fenotípica considerable incluso para desequilibrios genéticos muy similares [298]. Se hallaron también algunas CNVs que al momento de la realización de esta tesis fueron clasificadas como VUS. Para estas CNVs, se llevará a cabo una revisión periódica de la literatura para evaluar su posible implicancia clínica.

Todas las CNVs clínicamente relevantes halladas en los pacientes de nuestra cohorte ya fueron reportadas previamente en la literatura y en muchos de los casos el fenotipo fue compatible con los síndromes asociados a esos desbalances. Por ejemplo, el paciente PID 41 que presentaba una duplicación 7q11.23 y un fenotipo compatible con características previamente descritas, o el PID 167 con una ganancia completa del brazo largo del cromosoma 13 y fenotipo concordante con las características del síndrome de Patau. Sin embargo, y como ya mencionamos en la sección resultados y discutiremos más adelante, el hecho de que algunas de estas CNVs no se correspondan a CNVs recurrentes y presentan puntos de ruptura diferentes, contribuye a una mejor definición de la región crítica y/o a una mejor comprensión de la variabilidad fenotípica entre los pacientes. De destacar, además, es que 4 pacientes (44% de los que presentaron desbalances) poseían anomalías de un tamaño mayor a 5 Mb, superior al límite de resolución del análisis citogenético por microscopía. Sin embargo, en 2 de estos casos, al igual que en otros 2 con CNVs menores a 5Mb, no fue posible la determinación del cariotipo por fallas en la obtención de metafases en el cultivo celular de sangre periférica. Se describió previamente que las células de pacientes con anomalías cromosómicas pueden presentar dificultades para crecer en cultivo debido a una baja tasa de división celular, la entrada en anafase tardía o G0 o inducción de la apoptosis, lo que dificulta la determinación del cariotipo [299–302]. En concordancia con esos reportes, cuando se analizan pacientes con anomalías cromosómicas en mosaico mediante FISH en interfase y técnica de bandeo G en metafase, se observa frecuentemente diferencias en la proporción de las diferentes líneas celulares [302]. Por otra parte, los pacientes con anomalías cromosómicas tienen mal pronóstico de sobrevida, y es muy común que no sea posible la obtención de una segunda muestra de sangre para la determinación del cariotipo. Por lo tanto, la aplicación del análisis por array-CGH en esta población de pacientes aumenta la

probabilidad de arribar al diagnóstico certero y constituye una valiosa posibilidad para el asesoramiento genético oportuno.

Varios pacientes de nuestra cohorte en los cuales hallamos CNVs de relevancia clínica, poseían características diferenciales no necesariamente descritas en la literatura o bien no presentaban alguno de los rasgos clínicos ya reportados, que resulta interesante mencionar, así como puntos de rupturas de los rearreglos que nos permitieron definir genes candidatos asociados al síndrome y/o a las CC.

En la paciente PID 2 se halló una microdelección que comprende la región 2q24.2q31.1 cuyos puntos de corte no habían sido reportados previamente en la literatura. Esta paciente compartía algunas de las características clínicas ya descritas como ser rasgos dismórficos, microftalmia y CC [213,303,304]. Otras de las características descritas como las convulsiones, el retraso del crecimiento o el autismo no fueron evaluadas ya que la paciente fue incluida en el estudio en una etapa temprana del desarrollo. De cualquier manera, está descrito que la presentación clínica en este síndrome puede ser variable. De hecho, sólo la mitad de los pacientes con deleciones de 2q21q31 presentan ataques epilépticos, las características dismórficas reportadas son variables [180,181] y alrededor del 40% de los pacientes estudiados poseían CC [305].

Recientemente, se ha propuesto a *DLX1*, *DLX2*, *ATF2* y *TTN* como los principales genes candidatos causales del fenotipo cardíaco asociado a deleciones en esta región [213]. De estos cuatro genes, sólo *TTN* está curado como haploinsuficiente por el grupo de experto de ClinGen (ISCA-33419) debido a la presencia de variantes LOF y de deleciones en pacientes con MHC y dilatada. El paciente descrito en esta tesis no presenta una miocardiopatía y no posee deleción el gen *TTN*, pero sí los genes *DLX*.

Los genes *DLX* forman parte de una familia implicada en la regulación del desarrollo de los tejidos craneofaciales y la formación de extremidades en vertebrados [306–308] y jugarían un papel importante en el desarrollo del corazón debido a su influencia en la migración de células de la cresta neural [307,309]. A la fecha no hay descritas variantes puntuales en los genes *DLX1* y 2 asociados a CC en bases de datos de pacientes como DECIPHER y ClinVar, se identificaron variantes de secuencia en *DLX6* en pacientes con TDF [310]. Si bien aún no existe suficiente evidencia para que los genes *DLX* puedan ser considerados como haploinsuficientes según los expertos de ClinGen (*DLX1*: ISCA-34910, *DLX2*: ISCA-2346), el hallazgo de la deleción en esta paciente sumaría evidencia a la propuesta de que estos genes podrían influenciar la aparición

de CC [213]. En forma análoga, el hallazgo de esta CNV le restaría peso a la influencia de los genes *TTN* y *ATF2* en la aparición de las CC, ya que si bien se encuentran delecionados en el caso reportado por Zhu y colaboradores [213] no lo están en la paciente de nuestra cohorte.

Es interesante destacar que en los casos revisados por Pescucci y colaboradores [304], 6 pacientes presentaron CC y FLAP (o una anomalía del paladar) y 5 casos presentaban ausencia de ambas. La relación entre estas anomalías congénitas ya fue descripta previamente [311]. Asimismo, se reportó que los embriones de ratones expresan los parálogos *Dlx1* y *Dlx2* en el primer arco faríngeo [312], y que aquellos que carecen de las actividades de estos genes (ratones *Dlx1/2^{-/-}*) presentan paladar hendido [313]. Por su parte, Gaczkowska y colaboradores detectaron una asociación del gen *DLX1* con el riesgo de fisuras orales en humanos [314]. Considerando estos antecedentes, proponemos que estos dos tipos de defectos presentes en el paciente de nuestra cohorte -y en 6 casos reportados por Pescucci y colaboradores [304]- tendrían una misma etiología que se asociaría con la delección de uno o ambos genes *DLX*. *DLX* ejercería una función en las células del primer arco faríngeo, lugar (en el 1er y segundo arco) donde se ubican las células del mesodermo faríngeo que migran para formar el corazón. Es importante, por lo tanto, seguir sumando casuística para entender en profundidad la posible implicancia de estos genes en los mecanismos subyacentes en las cardiopatías.

Otro ejemplo para destacar, son los resultados obtenidos en la familia de PID 100 que arrojaron la presencia en ambas pacientes afectadas con MMIHS de 2 variantes patogénicas: una delección de 5 pb heredada de la madre y una delección de 643 Kb en 16p13.11 que contiene los genes *MYH11*, *NDE1* y *ABCC6* heredada del padre. En la actualidad se han reportado sólo 7 casos, incluyendo las 2 pacientes de nuestra cohorte, que poseen MMIHS y variantes en *MYH11* [183,197,214,215,218]. Si bien la mayor parte del fenotipo MMIHS se explica por la herencia AR de este gen, las pacientes de nuestra cohorte presentaban también una CIA, fenotipo no asociado al gen *MYH11* hasta la fecha.

La CIA es una cardiopatía congénita cuya aparición se debe a diversos factores, tanto genéticos como ambientales. Luego de la revisión realizada de los casos reportados en las bases de datos que poseen deleciones de los genes presentes en el intervalo delecionado en las pacientes, no parece haber una asociación directa entre la CIA y la haploinsuficiencia de *MYH11*, *NDE1* y *ABCC6* individualmente o de los tres como síndrome de genes contiguos. Sin embargo, si se tiene en cuenta a los pacientes reportados que presentan megacystis fetal y aunque no se dispone de evidencia que sugiera que las variantes en *MYH11* den lugar a CIA, se observa que

el 10 % tiene defectos cardíacos y un 1 % posee defectos septales [315]. Estas observaciones sumarían evidencia a la asociación del fenotipo megacystis con las CC.

Por otro lado, *MYH11* se asocia de manera AD a cardiopatía aórtica hereditaria TAAD (OMIM:132900) y al DAP [50]. Este fenotipo tiene heterogeneidad de locus y entre los genes implicados en esta heterogeneidad se encuentra el *ACTA2* (OMIM: 611788) que codifica para la alfa actina 2 que es propia del músculo liso. Se ha demostrado que el gen *ACTA2*, que está relacionado estructuralmente con *MYH11* en la aorta y que es una causa de TAAD, está también implicado en la aparición de DAP [316–318]. También se observaron algunas variantes relacionadas con la aparición de CIA [318,319]. Aunque estos dos genes tienen funciones distintas, la heterogeneidad de locus para TAAD podría sugerir un posible vínculo similar con CIA, sin descartar la posible contribución de otros factores genéticos y/o ambientales en su desarrollo.

Como ya se nombrara, el paciente PID 149 destacaba por su fenotipo complejo con una poliposis intestinal que también presentaban su padre y su abuela paterna. El análisis del array-CGH mostró una delección en el gen *APC* (OMIM # 175100) heredada de su padre, que probablemente conduce a una proteína no funcional o a la degradación de su ARNm por NMD. Si bien hay poca información que vincule directamente al gen *APC* con cardiopatías congénitas, se postuló que, durante el desarrollo tardío del corazón, la delección de *APC* en las células del miocardio afecta la proliferación celular y la señalización de β -catenina, un efector nuclear de la vía de señalización de Wnt, que tendría consecuencias en el desarrollo adecuado del corazón [220]. Sin embargo, en los pacientes con variantes de pérdida de función o delecciones en *APC* no suelen reportarse CC. Como sugieren Capra y colaboradores [320], cuando los hallazgos no concuerdan con el diagnóstico primario, existe la posibilidad que las características clínicas del paciente se deban a dos condiciones genéticas relativamente comunes o raras. En estos pacientes, un diagnóstico completo explica su fenotipo atípico y mejora su manejo clínico.

Considerando que la delección no explicaba completamente el fenotipo del paciente, realizamos SM y hallamos una variante patogénica en el gen *EP300*. Esta variante predice un codón de terminación prematuro en el último exón del gen que daría lugar a una proteína trunca. Las variantes patogénicas en los genes *CREBBP* y *EP300* son conocidas como causas del síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS) tipos 1 y 2.

CREBBP y su parólogo *EP300* son dos enzimas evolutivamente conservadas y funcionalmente

relacionadas. Comparten una arquitectura de dominios similar que consiste en una serie de módulos de unión a proteínas y ADN, son dos reguladores estrechamente relacionados, se expresan ampliamente dentro y fuera del sistema hematopoyético y pueden actuar como activadores o supresores de tumores. Regulan diversas funciones fisiológicas claves como la apoptosis celular, la proliferación y diferenciación, la reparación del ADN y la reprogramación de células somáticas [321].

Se describió que tanto las proteínas truncas como la ausencia de un alelo de *CREBBP* se relacionan con la aparición de RTS. El hallazgo de pacientes con microdeleciones de una copia del gen *CREBBP* completo respaldan un modelo de haploinsuficiencia para los efectos de *CREBBP*. Otra observación interesante indica que un producto de proteína aberrante derivado del alelo mutante inhibe la proteína de tipo salvaje, lo que respalda un modelo dominante negativo de la enfermedad [322].

En el caso de *EP300*, las variantes en el dominio HAT se asocian con RTS tipo 2, mientras que las variantes fuera de ese dominio pueden dar lugar a diferentes fenotipos. Aunque la variante en este paciente estaba fuera del dominio HAT, sus características coincidían con los síntomas comunes de RTS tipo 2. Se describieron otras variantes de secuencia en *EP300* río abajo de la que presenta el paciente de nuestra cohorte que se corresponden con cambios de marcos de lectura o pérdida de codón de terminación, y por ende con la generación de un carboxi-terminal de la proteína diferente [201,223] (RCV001027441.1). Estos pacientes presentaban un fenotipo RST tipo 2 leve en lo que respecta a la DI y las anomalías esqueléticas asociadas a RTS [201,223]. De destacar, es el hecho que el número de variantes patogénicas reportadas en el exón 31 de *EP300* es bajo en comparación con el tamaño del exón. Por lo tanto, se sugirió que no se puede descartar que haya pacientes que no fueron considerados compatibles con los criterios de inclusión de las cohortes estudiadas en búsqueda de variantes en *EP300* si las variantes en este exón causan un fenotipo leve y variado [201].

Si bien no se puede descartar una interrelación o sinergia entre la consecuencia de una delección en el gen *APC* y la variante en *EP300* como una explicación adecuada para la mayoría de las características que exhibía el paciente de nuestra cohorte, Lavery y colaboradores [322] proponen que defectos en proteínas activadoras de la transcripción en vías importantes para el desarrollo se vinculan con cinco genes que están implicados en tres enfermedades epigenéticas congénitas: el síndrome de Kabuki (tipo 1 [KMT2D] y 2 [KDM6A]), el síndrome de Rubinstein-Taybi (tipo 1 [CBP] y 2 [EP300]) y el síndrome de Kleefstra tipo 2 (KMT2C). Los componentes

moleculares del complejo COMPASS KMT2C/D (*Type 2 lysine methyltransferases complex of proteins associating with Set1*) y sus proteínas *partners* promueven la expresión génica de *loci* específicos mediante la modificación de la histona-3, generalmente fomentando configuraciones eucromáticas activas. Modulan la actividad de diversos tipos celulares críticos para la morfogénesis embrionaria, el desarrollo del sistema nervioso central y la supervivencia posnatal y dependen funcionalmente de las enzimas de acetilación de histonas p300 (EP300/CBP) [322]. Los vínculos genéticos y moleculares entre estas enfermedades se fortalecen aún más por la considerable superposición fenotípica observada en sujetos diagnosticados con estos síndromes. Además de la DI y las anomalías conductuales, también se observan en una alta frecuencia defectos estructurales claves como ser baja estatura, anomalías esqueléticas, defectos cardiovasculares y defectos craneofaciales en las tres condiciones; las anomalías craneofaciales son una característica muy prevalente de las tres enfermedades. Si bien existirían algunas características faciales específicas de cada síndrome según la literatura, en la práctica se observa una considerable superposición de los rasgos clínicos en los sujetos diagnosticados con estos síndromes. Asimismo, sugieren que ninguna característica dismórfica específica se considera patognomónica para ninguno de estos diagnósticos y que la penetrancia/expresividad de las características individuales es heterogénea [322].

El paciente PID 134 en el que se halló una delección en el cromosoma 1 en la región p36 y una duplicación en el cromosoma 7 en la región q35, presentaba algunas de las características clínicas compatibles con las descritas en el síndrome de microdelección 1p36 (como ser las fontanelas anchas, orejas displásicas y la anomalía de Ebstein [187,188]) además de hidrocefalia, CIV y RCIU, características descritas para los 2 desequilibrios [185–188,323]. El niño falleció en el período neonatal y estimamos que probablemente haya sido como resultado de la sinergia de los cambios de dosis debidos a ambos desequilibrios.

La monosomía 1p36 es uno de los síndromes de microdelección más frecuentes, con una incidencia aproximada de 1 cada 5000 nacimientos vivos. Este síndrome está asociado con rasgos faciales característicos, anomalías cardíacas, convulsiones y retraso mental entre otros, todos los cuales se cree que son el resultado de la haploinsuficiencia de genes dentro de la región 1p36. El tamaño de la delección varía desde aproximadamente 1.5 Mb hasta 10 Mb, con los puntos de ruptura más comunes ubicados en 1p36.13 hasta 1p36.33. Más del 70% de los pacientes con delección 1p36 tienen una delección terminal, mientras que otro 7% poseen delecciones intersticiales. Una proporción de pacientes tiene un cromosoma 1 derivado en el cual

el telómero 1p es reemplazado por material de otro cromosoma, ya sea como resultado de una reorganización *de novo* [324] -como el caso de este paciente PID 134- o como consecuencia de la mala segregación en la meiosis de una translocación parental aparentemente balanceada [325,326].

En el caso de la paciente PID 329 se halló una delección en la región 19q13.42q13.43 cuyos puntos de corte no habían sido reportados previamente en la literatura. Se han descrito casos similares o comparables en tamaño y contenido génico en bases de datos de pacientes, algunos de los cuales presentan síntomas y fenotipos compatibles con la delección encontrada en esta paciente, como ser retraso del desarrollo, fisura palatina y retrognatia. La delección abarca un total de 53 genes que codifican proteínas, entre los que se encuentra el *TNNI3*, que según el equipo de ClinGen posee leve evidencia para ser considerado haploinsuficiente. Se ha observado que las variantes de pérdida de función en *TNNI3* están asociadas con distintos tipos de miocardiopatía, incluyendo la hipertrófica, restrictiva y dilatada. Respecto de las CC, uno de los pacientes reportados (DECIPHER, ID: 257434) poseía una CIA mientras que la paciente de nuestra cohorte presentaba EP. Además de los genes relacionados con cardiopatías (ver sección resultados), en este intervalo mapea el gen *IL11*, que desempeña un papel clave en la regulación del sistema inmunológico y en varios procesos biológicos. Aunque no se ha asociado un fenotipo específico a este gen hasta la fecha, investigaciones recientes sugieren su importancia en la transición de fibroblastos a miofibroblastos mediada por TGF- β , que se ejercería a través de la producción de IL-11 [239]. Pero el papel más estudiado hasta la fecha de esta citocina es su relevancia en respuesta a lesiones cardíacas, como el infarto de miocardio y la hipertensión, donde se observa un aumento significativo en la expresión de IL-11 en el corazón [327].

El paciente PID 362 presentó una delección en la región 3p21.31 y fue descrito en detalle en la sección resultados en comparación con otros casos reportados con deleciones en esta región. El análisis de nuestro paciente, así como la revisión bibliográfica realizada en esta tesis, nos permite describir que los rasgos fenotípicos de los pacientes con deleciones en esta región son muy variables. Las características halladas más frecuentemente son: retraso en el desarrollo (47%), hipertelorismo (37%), CC (37%), discapacidad intelectual (31%), implantación baja de orejas (31%), retraso en el habla (26%), hipotonía (26%) y micrognatia (26%). Proponemos, además, que 2 de los genes que mapean en este intervalo, *SETD2* y *TREX1*, se asociarían principalmente al fenotipo no cardíaco, mientras que otros 2, *MYL3* y *SMARCC1*, estarían implicados con las CC. Por su parte, *QRICH1* tendría implicancias tanto en el fenotipo cardíaco

como en el extracardiaco. La evidencia científica destaca que efectivamente existe más de un gen en la región implicado en CC y que si bien no es necesario que todos se encuentren afectados para generar fenotipo, no se puede descartar un efecto sinérgico producto de la ausencia de más de uno de ellos [193].

El análisis de variantes puntuales se realizó en una primera etapa con el estudio de uno de los genes para el que se poseía más información de su implicancia en el desarrollo de las CC, el gen *NKX2-5*. Este gen es un factor de transcripción del tipo *homeobox*, es un regulador muy importante del desarrollo cardíaco temprano y desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica específica del tejido necesario para el desarrollo del corazón en todas las especies [328,329]. Por otro lado, fue el primer gen en el que se describió la presencia de variantes puntuales en CC [330].

Los análisis realizados para evidenciar cambios de secuencia en el gen *NKX2-5* no arrojaron presencia de variantes (incluyendo las nóveles halladas) que en principio se asocien a la afección. Sin embargo, se describió que algunas variantes que no producen cambio de aminoácidos (variantes sinónimas) podrían ejercer un efecto modulador sobre la función del gen como factor de transcripción [331,332]. De cualquier manera, el hallazgo de variantes noveles en individuos de nuestra población amerita el análisis de más individuos a los efectos de establecer sus posibles implicancias en la patogenia de las CC. Por otro lado, si bien se describió que alrededor del 5-20% de los pacientes con CC presentan variantes puntuales como causa de su afección, las mismas son más frecuentes en pacientes con antecedentes familiares o sindrómicos [125,137,138]. Asimismo, se espera que el número de pacientes que presenten variantes en un determinado gen sea reducido debido a la cantidad de genes implicados en la patología, por lo que sería necesario el análisis de un número elevado de individuos en cada caso.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se seleccionaron entonces pacientes para ser estudiados mediante secuenciación masiva de nueva generación que permite el análisis de varios genes en paralelo. La selección de los pacientes comprendió un análisis exhaustivo de su fenotipo realizado en conjunto con los médicos genetistas, para incluir aquellos pacientes que nuevamente pudieran beneficiarse con mayor probabilidad de este análisis ya que, al igual que la metodología de array-CGH, esta metodología aún es muy costosa en nuestro medio en especial en el ámbito de la salud pública.

Nuestros resultados arrojaron la presencia de 10 variantes patogénicas o probablemente patogénicas y 2 variante de significado incierto en 11 de los 17 (64,7%) pacientes analizados (1 paciente del grupo A y 16 del grupo B). Para las VUS, al igual que para las CNVs de significado incierto halladas, se realizará un relevamiento periódico de la literatura a fin de estimar su posible implicancia clínica.

En 2021, Mone y colaboradores [333], llevaron a cabo un estudio prospectivo en pacientes con CC detectadas prenatalmente en el que analizaron un total de 197 tríos (compuestos por el feto, el padre y la madre) que se sometieron a SM después de haber obtenido resultados normales en los análisis de array-CGH y cariotipo. Los resultados revelaron un rendimiento diagnóstico adicional para todos los casos de CC del 12,7%, 11,5% para CC aisladas y del 14,7% para CC asociadas con otra AC. Además, realizaron una revisión bibliográfica que abarcó 18 estudios con un conjunto total de 636 casos de CC. En conjunto los rendimientos diagnósticos fueron del 21%, 11% y 37% para los mismos grupos, respectivamente.

Nuestro alto porcentaje de resolución de la SM se explica fundamentalmente por el análisis exhaustivo de los fenotipos y el conocimiento asociado de los genes que podrían estar condicionando estos fenotipos. Asimismo, y si bien no fue excluyente, se priorizó la presencia de otros afectados en la familia, así como la posibilidad de poseer muestras de los progenitores a fin de analizar si las variantes eran heredadas o *de novo*.

Si se organizan las variantes detectadas en grupos funcionales de genes, se hallaron 5 variantes en genes estructurales/sarcoméricos (los genes *MYH6*, *MYH7*, *MYH11*, *MYBPC3*), 4 en los genes de Rasopatías (3 variantes en *PTPN11* y 1 en *RAF1*) y 2 variantes en modificadores de histonas (*EP300* y *KAT6B*), todos ellos ampliamente reconocidos por su contribución a la patogénesis de las CC [50]. De destacar, es que de los 4 pacientes con variantes en los genes de Rasopatías, 3 -PID 129,175,335- presentaban una sospecha clínica clara de Rasopatía al momento de ser ingresados al estudio. El paciente PID114, por su parte, fue seleccionado por sus características fenotípicas que en conjunto generaban sospecha de una posible entidad génica.

En un estudio realizado por Calcagni y colaboradores [334], se analizó de manera retrospectiva y observacional los expedientes médicos de 371 pacientes que habían recibido un diagnóstico molecular confirmado de Rasopatía para evaluar cómo los genes mutados afectan la cantidad de intervenciones médicas y el pronóstico general en los pacientes. Los resultados revelaron que

el riesgo de requerir intervenciones médicas era más elevado en las personas con síndrome de Noonan y EP que tenían variantes patogénicas en el gen *PTPN11*, si bien, la tasa de mortalidad en general fue relativamente baja. No obstante, se observó una asociación específica entre la MCH, obstrucciones en las vías de salida biventriculares y las variantes en este gen que parecía estar vinculada a una mortalidad temprana, incluyendo eventos inmediatos postoperatorios y muerte súbita. Estos resultados resaltan que la identificación precisa de la variante genética subyacente en estos pacientes permite un enfoque de tratamiento altamente personalizado. El diagnóstico molecular proporciona información valiosa sobre el pronóstico de la enfermedad y conociendo la causa genética, los médicos pueden anticipar posibles complicaciones y riesgos específicos asociados con esa variante genética, lo que les permite brindar un mejor asesoramiento y orientación a los pacientes y sus familias. El diagnóstico temprano de una Rasopatía a través de pruebas moleculares permite una intervención más oportuna, ya que se pueden implementar medidas preventivas y estrategias de monitoreo adecuadas para detectar y abordar problemas médicos antes de que se vuelvan graves. Asimismo, el conocimiento acumulado a través del diagnóstico molecular contribuye a comprender mejor las causas y los mecanismos de estas enfermedades, lo que a su vez puede conducir al desarrollo de nuevas terapias y tratamientos más efectivos en el futuro.

Entre los genes relacionados a modificadores de histonas, además del gen *EP300* ya discutido anteriormente, se detectó una variante novel en el gen *KAT6B* en el paciente PID188 *de novo*. Esta variante involucra una duplicación de 2 pares de bases en el exón 18 que predice un codón de terminación prematuro y por ende muy probablemente una proteína trunca por situarse en el último exón.

El gen *KAT6B* codifica una histona acetiltransferasa que además de su actividad en la acetilación, también actúa como activador y represor transcripcional. Hasta la fecha se reportaron en ClinVar 126 variantes patogénicas y probablemente patogénicas, principalmente del tipo LOF o que generan una proteína trunca.

Actualmente se considera que variantes en este gen pueden dar lugar a un amplio espectro de signos y síntomas. Los extremos del espectro están relacionados con dos síndromes genéticos, el GPS y SBBYS [226]. Se ha propuesto una lista de criterios para diferenciar ambos síndromes donde los rasgos obligatorios que definen al SBBYS incluyen facies de máscara, blefarofimosis, ptosis, epicanto inverso y pulgares largos y hallux [226,337]. Mientras que los signos que mayoritariamente definen al GPS son la microcefalia con estrechamiento bitemporal y ojos

prominentes, anomalías renales y agenesia del cuerpo calloso. Las CC se observan en aproximadamente el 50% de los sujetos con cualquiera de los dos síndromes, siendo los defectos más frecuentes las CIA, CIV (como el que presentaba el paciente) y el FO permeable [226,337]. Las dismorfias faciales y pulgares largos/hallux como principales hallazgos en nuestro paciente sugieren claramente el diagnóstico de SBBYSS, y aunque los defectos cerebrales estructurales son poco comunes en estos pacientes, no se consideró que la agenesia del cuerpo calloso que presenta el paciente pudiera dar duda de su diagnóstico. Las variantes halladas en los pacientes informados con SBBYSS se localizan principalmente en los exones 13, 17 y 18. Las variantes que se encuentran en exones anteriores al exón 18 generan haploinsuficiencia, mientras que las más distales en el último exón son variantes del tipo de pérdida función [335–340].

En el paciente SA13 se detectaron 3 variantes de posible relevancia clínica, 2 clasificada como VUS en *MYH6* y *MYH7*, y 1 variante como probablemente patogénicas en *VEGFA*. A priori se hipotetizó que el fenotipo complejo del paciente podría estar dado por la sumatoria de los efectos sinérgicos de estas tres variantes heredadas de padres portadores. Asimismo, estimábamos que al buscar las variantes en el hermano afectado sólo con TDF, se observarían una o dos de las anteriores, compatible con la propuesta de una herencia oligogénica en CC [341–344]. Particularmente para los genes sarcómeros la presencia de múltiples variantes en otros genes sarcomericos puede resultar en un fenotipo clínico más grave [359]. Sin embargo, ninguna de las variantes estaba presente en el hermano afectado y los padres no lograron ser recontactados por los médicos en Salta. Una posible explicación es, que el fenotipo sea causado principalmente por algún efecto ambiental u otra anomalía genómica no detectable por estas técnicas en ambos hermanos y que estas variantes complejicen el fenotipo de SA13. Existe también la posibilidad de una falsa paternidad, situación que muchas veces se descubre luego de este tipo de análisis familiares.

Un hallazgo importante mediante SM fue la identificación de la variante (NM_000256.3):c.2176C>T en el gen *MYBPC3* en dos pacientes no relacionados, uno de los cuales presentaba TDF (PID 232), mientras que el otro tenía miocardiopatía no compactada (PID 351). En ambos casos, los pacientes heredaron la variante de sus madres asintomáticas, compatible con el hecho que se describió penetrancia incompleta y expresividad variable para variantes patogénicas en *MYBPC3*, con individuos que no presentan ningún síntoma hasta aquellos que presentan insuficiencia cardíaca y muerte súbita [345]. Esta variabilidad se encuentra tanto en la expresión fenotípica observada en pacientes con diferentes variantes de

secuencia causales, como en los familiares que portan la misma variante. Incluso existen casos reportados de gemelos idénticos que comparten la misma variante en *MYBPC3* y que tienen fenotipos y severidad de la enfermedad diferentes, lo que sugiere un posible impacto de diferentes factores en el desarrollo de la patología [345]. Consistente con la penetrancia incompleta y expresividad variable, Garcia-Castro y colaboradores [235] reportaron la misma variante hallada en los pacientes de nuestra cohorte en una paciente con MCH asintomática. Considerando que ambos pacientes heredaron la variante de sus madres asintomáticas, realizamos una búsqueda de la posible expresión diferencial del gen de acuerdo al origen parental, y a la fecha no existe evidencia de *imprinting* en este gen. Sin embargo, se observó desbalance alélico a nivel de la proteína en algunos pocos casos de variantes de cambio de sentido en *MYBPC3* en pacientes con MCH [345]

De nuestro conocimiento, existen a la fecha sólo 2 casos donde se asocia al gen *MYBPC3* con la TDF, pero en ambos casos, los pacientes poseían también otra variante en los genes *SOS1* o *ARVCF* [21,209]. Está descrito, de cualquier manera, que variantes en genes sarcómericos (conocidos por causar miocardiopatías) también se relacionan a CC. Algunos ejemplos son el gen *ACTC1* y el *MYH6* en casos de CIA familiar, variantes en *MYH7* en pacientes con anomalía de Ebstein, así como variantes en *MYH11* y DAP (generalmente en conjunto con TAAD). A su vez, la haploinsuficiencia de la elastina (*ELN*) causa CIV en el síndrome de Williams, mientras que las variantes patogénicas puntuales en este gen resultan en estenosis aórtica supravalvular y otras estenosis de grandes arterias sin un fenotipo sindrómico [346–354]. Asimismo, Granados y colaboradores [355] describen que estudios realizados en modelos animales que se centran en genes que codifican varias proteínas contráctiles apoyan la teoría que las proteínas sarcoméricas defectuosas expresadas durante el desarrollo cardíaco causan malformaciones cardíacas. El mismo fenómeno ocurre después de generar mutaciones en genes que codifican sensores y transductores endoteliales de tensión y de proteínas sensoras de contracción y tensión muscular cardíaca. A la luz de esta evidencia experimental, los autores proponen que el flujo sanguíneo intracardíaco temprano es un factor epigenético en la morfogénesis cardíaca y que su generación defectuosa (es decir la contracción, detección y transducción) podría inducir alteraciones morfológicas del órgano [356].

En concordancia con estas observaciones, nuestros resultados contribuyen al concepto de que los genes asociados a las miocardiopatías también podrían explicar la base genética de la TDF [209]. Finalmente, el probando presentaba agenesia parcial del cuerpo calloso y agenesia renal.

Si bien no se encontró ninguna CNV u otra variante de secuencia clínicamente relevante, no podemos descartar la participación de variantes en otros genes no incluidos en nuestra lista de genes de interés, o bien la presencia de variantes intrónicas que no se detectan por estas técnicas y/o la influencia de factores ambientales durante el embarazo que pueden contribuir en el desarrollo de las AC en el niño.

-CAPÍTULO VI-

CONCLUSIONES, LIMITACIONES Y RELEVANCIAS



VI.1 CONCLUSIONES

Del estudio realizado en la presente tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. De un total de 334 muestras ingresadas, se realizó el estudio de anomalías cromosómicas, desbalances genómicos y variantes puntuales en 236 pacientes con CC, hallándose alteraciones de relevancia clínica en el 25.84% de los casos. El estudio de pacientes con CCA y CC asociadas a otras anomalías congénitas no había sido abordado mediante estos algoritmos previamente en nuestro país previamente.
2. En conjunto, se detectó la Del22q11 en el 21% de los pacientes con CCC, similar a lo reportado por otros autores para las CCC.
3. La técnica de MLPA (kit P250) resultó ser más efectiva que la técnica de FISH en la detección de anomalías en la región 22q11. Además, permitió pesquisar otras regiones asociadas a CC.
4. La Del22q11 se detectó en una mayor proporción en pacientes con IAA (52.6%), con CIV+AP (38.7%) y TAP (38.5%). No se detectó esta delección en ningún paciente con TGV ni DSVD.
5. El 63.4% de los pacientes que poseen algún desbalance en 22q11, presentaron como única anomalía mayor la CC.
6. Se detectó la Del22q11 en 4 pacientes (11%) que poseían CC aisladas no conotruncales con sospecha de SDG.
7. El análisis por MLPA en combinación con la secuenciación de Sanger evidenció un paciente con una delección parcial del gen *TBX1* en un paciente con TGV.
8. El análisis de array-CGH evidenció que el 20.9% de las muestras analizadas tenían CNVs clínicamente relevantes (patogénicas o probablemente patogénicas).
9. El 44% de los pacientes con CNVs de relevancia clínica, poseen desbalances genómicos de tamaños por encima del límite de detección del cariotipo. Estos resultados refuerzan la importancia de utilizar esta técnica sobre todo en los neonatos con ACM dadas las limitaciones técnicas que normalmente se encuentran para la realización de los cariotipos en este grupo de pacientes.

10. Se describieron 6 CNVs novedales (sin puntos de corte recurrentes): 5 deleciones, en 3p21, 19q13, 5q22, 15q14 y 2q24 y una duplicación en 7q35.
11. Se aportó evidencia sobre genes candidatos para CC en tres de las regiones afectadas por los desbalances novedales: en la región 2q24 para los genes *DLX1* y *DLX2*, en la región 19q13 para los genes *TNNT1* y *TNNI3* y en la región 3p21.31 para los genes *MYL3*, *SMARCC1* y *QRICH1*
12. Se amplió la descripción fenotípica de las microdeleciones en 3p21.31 mediante una descripción exhaustiva del fenotipo del paciente y una revisión bibliográfica que permitió incluir dentro de la variabilidad fenotípica a las CC hasta ahora no descritas como fenotipos en bases de datos ni en la bibliografía.
13. Se hallaron variantes de relevancia clínica o posible relevancia clínica en 11 de los 17 (64.7%) pacientes analizados por secuenciación masiva.
14. El 41% de las variantes detectadas por SM fueron en genes estructurales / sarcoméricos, el 33% en genes de Rasopatías y el 16% en genes modificadores de histonas.
15. Se describieron 5 variantes novedales en pacientes de nuestra población en regiones codificantes de los genes *MYH6*:c.5276A>G, p.(Lys1759Arg), *KAT6B*:c.4572_4573dupTA,p.(Thr1525IlefsTer25), *MYH11*:c.3143-2_3145delAGTGC, p.?, *EP300*:c.7081C>T, p.(Gln2361Ter) y *MYH7*:c.671A>T, p.(Asn224Ile). Ninguna de ellas se encuentra descrita en bases de datos de población general. Aquellas variantes que se encuentran en la región codificante afectan a aminoácidos altamente conservados según los *scores* de conservación y los análisis bioinformáticos las predicen como deletéreas.
16. Se hallaron 7 variantes poco frecuentes de relevancia clínica o posible relevancia clínica previamente descritas en los genes *VEGFA* c.103G>T, p.(Glu35*), *MYH7*: c.2599G>A, p.(Glu867Lys), *PTPN11*:c.1381G>A, p.(Ala461Thr), *PTPN11*:c.922A>G, p.Asn308Asp, *PTPN11*:c.181G>A, p.(Asp61Asn), *MYBPC3*: c.2176C>T, p.(Arg726Cys) y *RAF1*:c.770C>T, p.(Ser257Leu).
17. Se describió el 5^{to} y 6^{to} caso de MMIHS con variantes patogénicas en *MYH11* y los dos primeros con CIA, asociando por primera vez este gen con defectos septales.

VI.2 LIMITACIONES

Todas las técnicas tienen sus límites de resolución, aún las más recientes y poderosas técnicas genómicas como el array-CGH y la secuenciación masiva. En el caso del array-CGH la resolución está condicionada por la cantidad y el diseño de las sondas presentes en el soporte físico. En cuanto a la secuenciación del exoma, a pesar de que se secuencian todas las regiones codificantes, éstas representan aproximadamente sólo el 1% del genoma total. Esto implica que no se posee información sobre las regiones regulatorias o intrónicas que podrían albergar variantes que afecten la transcripción o el procesamiento del ARN mensajero o regiones que podrían estar involucradas en la arquitectura de la cromatina, entre otras. Las regiones repetidas tampoco poseen buena resolución mediante la secuenciación de Illumina que fue mediante la cual se analizaron los pacientes de esta tesis. Tampoco es posible confirmar si la posición o la orientación de los exones es la correcta sin datos adicionales.

Otra de las limitaciones es que en el contexto de esta tesis no se llevaron a cabo ensayos funcionales para las variantes novedades halladas. De cualquier manera, se estima realizar algunos de estos estudios en un futuro cercano.

Nos enfrentamos también a la dificultad de no incluir en el estudio familias de gran tamaño que permitieran establecer correlaciones significativas entre genotipo y fenotipo. La reconexión con las familias de los afectados resultó también ser un desafío considerable debido a eventos como defunciones neonatales, separaciones, mudanzas o desinterés por seguir relacionados con el proyecto. Por lo tanto, es de vital importancia la inclusión de otros actores de la salud pública tales como asistentes sociales, enfermeras/os y personal administrativo en este tipo de trabajo, que se sumen a la logística necesaria y así garantizar la adherencia de las familias.

VI.3 RELEVANCIA

Teniendo en cuenta que la supervivencia en niños con CC ha aumentado significativamente desde la década de 1980 y que en la actualidad se espera que más del 97% de los niños con cardiopatías congénitas alcancen la edad adulta -lo que destaca la necesidad de un manejo a lo largo de toda la vida [357]- consideramos que esta tesis posee relevancia en varios aspectos, a saber:

POLÍTICAS E INTERVENCIONES SANITARIAS

1. La posibilidad de identificar la causa de la CC evita un número excesivo e innecesario de consultas médicas en busca del diagnóstico. Asimismo, permite orientar el tratamiento de los pacientes y valorar los riesgos de recurrencia para eventualmente tomar decisiones de planificación familiar.
2. El diagnóstico temprano de afectados con CCC aisladas que presentan Del22q11 permite un adecuado seguimiento clínico y contribuye al manejo y prevención de las posibles complicaciones posteriores.
3. La introducción en el ámbito público del estudio de array-CGH y de la secuenciación masiva, permite definir la causa de la CC en pacientes que de otra manera hubieran permanecido sin diagnóstico.

FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN SALUD

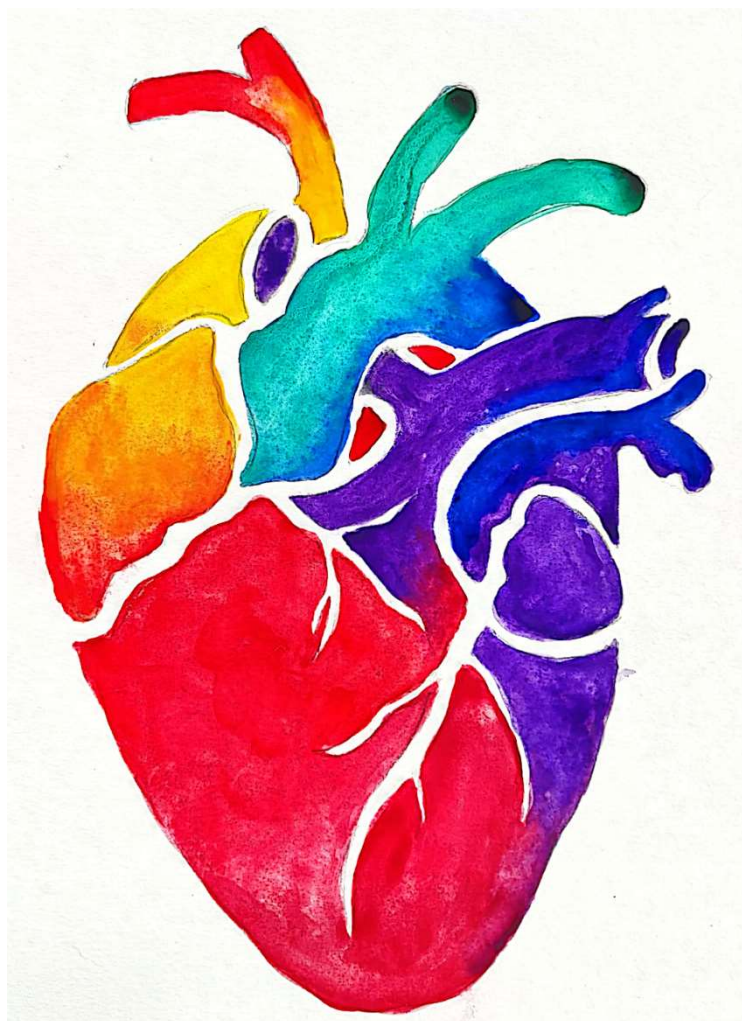
1. La conformación de un equipo multidisciplinario que incluya a médicos genetistas, cardiólogos, neonatólogos, epidemiólogos, citogenetistas, bioquímicos y biólogos moleculares para la investigación de las causas de las CC, es de vital importancia para arribar al diagnóstico de los pacientes.
2. El desarrollo de nuevos protocolos de estudio que incluya a diferentes profesionales de la salud permite extender este tipo de abordajes al estudio de otros afectados con CC.
3. La capacitación profesional en la interpretación de resultados de las nuevas tecnologías genómicas contribuye a su aplicación en la práctica clínica.
4. La información obtenida sobre las causas genéticas de las CC brinda al equipo de salud una comprensión más profunda de su etiología.

LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

1. La presencia de alteraciones genéticas como posible causa de la afección en niños con CC de nuestra población se describe por primera vez en forma integral. Este enfoque integral y de alcance nacional busca no solo mejorar el diagnóstico temprano de pacientes con AC y CC, sino también garantizar que los pacientes tengan igualdad de oportunidades de acceso a los recursos y servicios necesarios para su atención médica y seguimiento. Además, al establecer conexiones entre diferentes instituciones de salud y concientizar sobre estas condiciones, esperamos contribuir significativamente a la salud pública y al bienestar de la población en general.
2. Con los resultados obtenidos, se inician nuevas líneas de trabajo tendientes a profundizar en los mecanismos celulares y moleculares de las CC.
3. A partir de esta experiencia, es posible extender este tipo de abordajes a otras patologías de origen total o parcialmente genético.

-CAPÍTULO VII-

BIBLIOGRAFÍA



1. DeSilva M, Munoz FM, Mcmillan M, Kawai AT, Marshall H, Macartney KK, et al. Congenital anomalies: Case definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*. 2016;34: 6015–6026. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.047
2. CDC. 1.4 Congenital Anomalies - Definitions. In: Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. 30 Oct 2019 [cited 27 Apr 2020]. Available: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/surveillancemanual/chapters/chapter-1/chapter1-4.html>
3. Services for the Prevention and Management of Genetic Disorders and Birth Defects in Developing Countries: Report of a Joint WHO/WAOPBD Meeting, The Hague, 5-7 January 1999. World Health Organization, Human Genetics Programme; 1999. Available: <https://play.google.com/store/books/details?id=Mh2rHAAACAAJ>
4. Pan American Health Organization. Present and Future of Birth Defects Surveillance in the Americas. PAHO; 2019. Available: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51899>
5. Groisman B, Bidondo MP, Barbero P, Gili JA, Liascovich R. RENAC: Registro Nacional de Anomalías Congénitas de Argentina. *Archivos argentinos de pediatría*. 2013;111: 0–0. Available: https://www.researchgate.net/profile/Juan_Gili/publication/262762073_RENAC_Registro_Nacional_de_Anomalias_Congenitas_de_Argentina/links/53da661b0cf2631430c8235b.pdf
6. Stanford Medicine Children's Health. [cited 30 May 2023]. Available: <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=transposicindelosgrandesvasostga-90-P04926>
7. Burns P, Burns J. Fetal Circulation. [cited 1 Jun 2023]. Available: <http://www.pted.org/?id=sp/fetal1>
8. Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 2003;89: 806–814. doi:10.1136/heart.89.7.806
9. Jain R, Epstein JA. Competent for commitment: you've got to have heart! *Genes Dev*. 2018;32: 4–13. doi:10.1101/gad.308353.117
10. Embriología básica cardíaca. In: *Pediatría integral* [Internet]. 28 Dec 2021 [cited 1 Jun 2023]. Available: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2021-12/embriologia-basica-cardiaca/>
11. Witman N, Zhou C, Grote Beverborg N, Sahara M, Chien KR. Cardiac progenitors and paracrine mediators in cardiogenesis and heart regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;100: 29–51. doi:10.1016/j.semcdb.2019.10.011
12. Postma AV, Bezzina CR, Christoffels VM. Genetics of congenital heart disease: the contribution of the noncoding regulatory genome. *J Hum Genet*. 2016;61: 13–19. doi:10.1038/jhg.2015.98
13. Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *Eur J Med Genet*. 2014;57: 402–413. doi:10.1016/j.ejmg.2014.04.010
14. Edwards JJ, Gelb BD. Genetics of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2016;31: 235–241. doi:10.1097/HCO.0000000000000274
15. Srivastava D. Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu Rev Pathol*. 2006;1: 199–213. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100039

16. Waardenberg AJ, Ramialison M, Bouveret R, Harvey RP. Genetic networks governing heart development. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4: a013839. doi:10.1101/cshperspect.a013839
17. Anatomía y Fisiología 1e (OpenStax): Desarrollo del Corazón. In: LibreTexts Español [Internet]. Libretexts; 30 Oct 2022 [cited 1 Jun 2023]. Available: https://espanol.libretexts.org/Salud/Anatom%C3%ADa_y_Fisiolog%C3%ADa/Libro%3A_Anatom%C3%ADa_y_Fisiolog%C3%ADa_1e_%28OpenStax%29/Unit_4%3A_Fluidos_y_Transporte/19%3A_El_Sistema_Cardiovascular_-_El_Coraz%C3%B3n/19.05%3A_Desarrollo_del_Coraz%C3%B3n
18. Taboada Lugo N. Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas. Parte 1 de 2: Morfogénesis cardíaca. *CorSalud*. 2019;11: 233–240. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2078-71702019000300233
19. Moore KL, Persaud TVN. Aparato Cardiovascular. En: *Embriología Clínica*. Barcelona: Elsevier; 2011.
20. Pawlak M, Niescierowicz K, Winata CL. Decoding the Heart through Next Generation Sequencing Approaches. *Genes*. 2018. p. 289. doi:10.3390/genes9060289
21. LaHaye S, Corsmeier D, Basu M, Bowman JL, Fitzgerald-Butt S, Zender G, et al. Utilization of Whole Exome Sequencing to Identify Causative Mutations in Familial Congenital Heart Disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9: 320–329. doi:10.1161/CIRCGENETICS.115.001324
22. Rabbani B, Tekin M, Mahdiah N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014;59: 5–15. doi:10.1038/jhg.2013.114
23. Agopian AJ, Mitchell LE, Glessner J, Bhalla AD, Sewda A, Hakonarson H, et al. Genome-wide association study of maternal and inherited loci for conotruncal heart defects. *PLoS One*. 2014;9: e96057. doi:10.1371/journal.pone.0096057
24. Calcagni G, Unolt M, Digilio MC, Baban A, Versacci P, Tartaglia M, et al. Congenital heart disease and genetic syndromes: new insights into molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17: 861–870. doi:10.1080/14737159.2017.1360766
25. Mandrycky CJ, Williams NP, Batalov I, El-Nachef D, de Bakker BS, Davis J, et al. Engineering Heart Morphogenesis. *Trends Biotechnol*. 2020. doi:10.1016/j.tibtech.2020.01.006
26. Andersen TA, Troelsen K de LL, Larsen LA. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71: 1327–1352. doi:10.1007/s00018-013-1430-1
27. Ugur B, Chen K, Bellen HJ. Drosophilatools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*. 2016. pp. 235–244. doi:10.1242/dmm.023762
28. Aránega AE, Velez C, Prados J, Melguizo C, Marchal JA, Arena N, et al. Modulation of alpha-actin and alpha-actinin proteins in cardiomyocytes by retinoic acid during development. *Cells Tissues Organs*. 1999;164: 82–89. doi:10.1159/000016645
29. Hidaka K, Lee J, Kim HS, Ihm CH, Iio A, Ogawa M, et al. Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *The FASEB Journal*. 2003. pp. 740–742. doi:10.1096/fj.02-0104fje
30. Honda M, Hamazaki TS, Komazaki S, Kagechika H, Shudo K, Asashima M. RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333: 1334–1340.

doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.202

31. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29: 1525–1539. doi:10.1006/jmcc.1997.0433
32. Stefanovic S, Zaffran S. Mechanisms of retinoic acid signaling during cardiogenesis. *Mech Dev.* 2017;143: 9–19. doi:10.1016/j.mod.2016.12.002
33. Zaffran S, Robrini NE, Bertrand N. Retinoids and Cardiac Development. *Journal of Developmental Biology.* 2014;2: 50–71. doi:10.3390/jdb2010050
34. Mazzotta S, Neves C, Bonner RJ, Bernardo AS, Docherty K, Hoppler S. Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development. *Stem Cell Reports.* 2016;7: 764–776. doi:10.1016/j.stemcr.2016.08.008
35. Addis RC, Epstein JA. Induced regeneration--the progress and promise of direct reprogramming for heart repair. *Nat Med.* 2013;19: 829–836. doi:10.1038/nm.3225
36. Bodmer R, Frasch M. 5 - Genetic Determination of Drosophila Heart Development. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart Development.* San Diego: Academic Press; 1999. pp. 65–90. doi:10.1016/B978-012329860-7/50007-6
37. Lantigua Cruz A, Hernández Fernández R, Quintana Aguilar J, Morales Peralta E, Barrios García B, Rojas Betancourt I, et al. Introducción a la genética médica. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 2011; 160–161.
38. Giraldo M, Parra S, Rojas M. Señalización celular. Fondo Editorial Biogénesis. 2006; 219–231. Available: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/download/325990/20783281>
39. An Y, Duan W, Huang G, Chen X, Li L, Nie C, et al. Genome-wide copy number variant analysis for congenital ventricular septal defects in Chinese Han population. *BMC Med Genomics.* 2016;9: 2. doi:10.1186/s12920-015-0163-4
40. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001;106: 709–721. doi:10.1016/s0092-8674(01)00493-7
41. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet.* 2001;28: 276–280. doi:10.1038/90123
42. Han H, Chen Y, Liu G, Han Z, Zhao Z, Tang Y. GATA4 transgenic mice as an in vivo model of congenital heart disease. *Int J Mol Med.* 2015;35: 1545–1553. doi:10.3892/ijmm.2015.2178
43. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkelä R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res.* 2004;63: 196–207. doi:10.1016/j.cardiores.2004.03.025
44. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012;148: 1172–1187. doi:10.1016/j.cell.2012.02.005
45. Engreitz JM, Ollikainen N, Guttman M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17: 756–770. doi:10.1038/nrm.2016.126
46. Xue Z, Hennelly S, Doyle B, Gulati AA, Novikova IV, Sanbonmatsu KY, et al. A G-Rich Motif in

- the lncRNA Braveheart Interacts with a Zinc-Finger Transcription Factor to Specify the Cardiovascular Lineage. *Mol Cell*. 2016;64: 37–50. doi:10.1016/j.molcel.2016.08.010
47. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell*. 2013;24: 206–214. doi:10.1016/j.devcel.2012.12.012
48. Sauvageau M, Goff LA, Lodato S, Bonev B, Groff AF, Gerhardinger C, et al. Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *Elife*. 2013;2: e01749. doi:10.7554/eLife.01749
49. Montanari DF, Obregon MG. ¿Cuál es la importancia de las cardiopatías en el conjunto de los defectos congénitos? *Archivos argentinos de pediatría*. 2005;103: 180–184. Available: https://www.researchgate.net/profile/Maria_Obregon/publication/262741756_Cual_es_la_importancia_de_las_cardiopatias_en_el_conjunto_de_los_defectos_congenitos/links/56a63ac808aebf168e322c18.pdf
50. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138: e653–e711. doi:10.1161/CIR.0000000000000606
51. Marelli AJ, Ionescu-Ittu R, Mackie AS, Guo L, Dendukuri N, Kaouache M. Lifetime prevalence of congenital heart disease in the general population from 2000 to 2010. *Circulation*. 2014;130: 749–756. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008396
52. Bolunduț AC, Lazea C, Miha CM. Genetic Alterations of Transcription Factors and Signaling Molecules Involved in the Development of Congenital Heart Defects-A Narrative Review. *Children*. 2023;10. doi:10.3390/children10050812
53. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy M-K, Li N, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970–2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol*. 2019;48: 455–463. doi:10.1093/ije/dyz009
54. Kopf PG, Walker MK. Overview of developmental heart defects by dioxins, PCBs, and pesticides. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2009;27: 276–285. doi:10.1080/10590500903310195
55. Mutluer FO, Çeliker A. General Concepts in Adult Congenital Heart Disease. *Balkan Med J*. 2018;35: 18–29. doi:10.4274/balkanmedj.2017.0910
56. Suluba E, Shuwei L, Xia Q, Mwanga A. Congenital heart diseases: genetics, non-inherited risk factors, and signaling pathways. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2020;21: 11. doi:10.1186/s43042-020-0050-1
57. Baumgartner H, Bonhoeffer P, De Groot NM, De Haan F, Deanfield JE, Galie N, et al. Association for European Paediatric Cardiology (AEPC); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC Guidelines for the management of grown-up congenital heart disease (new version 2010). *Eur Heart J*. 2010;31: 2915–2957.
58. Garcia RU, Peddy SB. Heart Disease in Children. *Prim Care*. 2018;45: 143–154. doi:10.1016/j.pop.2017.10.005
59. Azamian M, Lalani SR. Cytogenomic Aberrations in Congenital Cardiovascular Malformations. *Mol Syndromol*. 2016;7: 51–61. doi:10.1159/000445788
60. Miller A, Riehle-Colarusso T, Alverson CJ, Frías JL, Correa A. Congenital heart defects and

- major structural noncardiac anomalies, Atlanta, Georgia, 1968 to 2005. *J Pediatr.* 2011;159: 70–78.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2010.12.051
61. Gill HK, Splitt M, Sharland GK, Simpson JM. Patterns of recurrence of congenital heart disease: an analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42: 923–929. doi:10.1016/s0735-1097(03)00853-2
 62. Burn J, Brennan P, Little J, Holloway S, Coffey R, Somerville J, et al. Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet.* 1998;351: 311–316. doi:10.1016/s0140-6736(97)06486-6
 63. Øyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PKA, Melbye M. Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation.* 2009;120: 295–301. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.857987
 64. Rose V, Gold RJ, Lindsay G, Allen M. A possible increase in the incidence of congenital heart defects among the offspring of affected parents. *J Am Coll Cardiol.* 1985;6: 376–382. doi:10.1016/s0735-1097(85)80175-3
 65. Brenner JI. Cardiac Malformations in Relatives of Infants With Hypoplastic Left-Heart Syndrome. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine.* 1989. p. 1492. doi:10.1001/archpedi.1989.02150240114030
 66. Hinton RB Jr, Martin LJ, Tabangin ME, Mazwi ML, Cripe LH, Benson DW. Hypoplastic left heart syndrome is heritable. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50: 1590–1595. doi:10.1016/j.jacc.2007.07.021
 67. Lewin MB, McBride KL, Pignatelli R, Fernbach S, Combes A, Menesses A, et al. Echocardiographic evaluation of asymptomatic parental and sibling cardiovascular anomalies associated with congenital left ventricular outflow tract lesions. *Pediatrics.* 2004;114: 691–696. doi:10.1542/peds.2003-0782-L
 68. Loffredo CA, Chokkalingam A, Sill AM, Boughman JA, Clark EB, Scheel J, et al. Prevalence of congenital cardiovascular malformations among relatives of infants with hypoplastic left heart, coarctation of the aorta, and d-transposition of the great arteries. *Am J Med Genet A.* 2004;124A: 225–230. doi:10.1002/ajmg.a.20366
 69. McBride KL, Pignatelli R, Lewin M, Ho T, Fernbach S, Menesses A, et al. Inheritance analysis of congenital left ventricular outflow tract obstruction malformations: Segregation, multiplex relative risk, and heritability. *Am J Med Genet A.* 2005;134A: 180–186. doi:10.1002/ajmg.a.30602
 70. Shabana NA, Shahid SU, Irfan U. Genetic Contribution to Congenital Heart Disease (CHD). *Pediatr Cardiol.* 2020;41: 12–23. doi:10.1007/s00246-019-02271-4
 71. Rohit M, Shrivastava S. Acyanotic and Cyanotic Congenital Heart Diseases. *Indian J Pediatr.* 2018;85: 454–460. doi:10.1007/s12098-017-2454-6
 72. Ratti C, Veronesi B, Grassi L, Bompani B. Congenital heart diseases in clinical practice. *Recenti Prog Med.* 2012;103: 213–217. Available: <https://europepmc.org/article/med/22677948>
 73. Pierpont MEM, Moller JH. *The Genetics of Cardiovascular Disease.* Springer Science & Business Media; 2012. Available: https://play.google.com/store/books/details?id=2_MxBwAAQBAJ
 74. Grohmann D. Mitotische Wachstumsintensität des embryonalen und fetalen Huhnchenherzens und ihre Bedeutung für die Entstehung von Herzmissbildungen. *Zeitschrift für Zellforschung und*

- Mikroskopische Anatomie. 1961. pp. 104–122. doi:10.1007/bf00319331
75. Rychter Z. Analysis of relations between aortic arches and aorticopulmonary septation. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1978;14: 443–448. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/737313>
 76. de la Cruz MV, Sánchez Gómez C, Arteaga MM, Argüello C. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J Anat.* 1977;123: 661–686. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/885781>
 77. Okamoto N, Satow Y, Hidaka N, Akimoto N. Anomalous development of the conotruncus in neutron-irradiated rats. Etiology and morphogenesis of congenital heart disease Futura, Mount Kisco, New York. 1980; 195–214.
 78. Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science.* 1983;220: 1059–1061. doi:10.1126/science.6844926
 79. Pierpont MEM, Moller JH, editors. *The Genetics of Cardiovascular Disease.* Springer, Boston, MA; 1987. doi:10.1007/978-1-4613-2305-1
 80. Greenwood RD, Rosenthal A, Sommer A, Wolff G, Craenen J. Cardiovascular malformations in oculoauriculovertebral dysplasia (Goldenhar syndrome). *J Pediatr.* 1974;85: 816–818. doi:10.1016/s0022-3476(74)80349-5
 81. ARDINGER, H H. Cardiovascular anomalies in craniofacial disorders : Pathogenetic and epidemiologic implications. *Proc Greenwood Genet Center.* 1985;4: 82A. Available: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10007735102/>
 82. Freedom RM, Rosen FS, Nadas AS. Congenital cardiovascular disease and anomalies of the third and fourth pharyngeal pouch. *Circulation.* 1972;46: 165–172. doi:10.1161/01.cir.46.1.165
 83. Moerman P, Goddeeris P, Lauwerijns J, Van der Hauwaert LG. Cardiovascular malformations in DiGeorge syndrome (congenital absence of hypoplasia of the thymus). *Heart.* 1980. pp. 452–459. doi:10.1136/hrt.44.4.452
 84. Hittner HM, Hirsch NJ, Kreh GM, Rudolph AJ. Colobomatous microphthalmia, heart disease, hearing loss, and mental retardation--a syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1979;16: 122–128. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/458518>
 85. Siebert JR, Graham JM Jr, MacDonald C. Pathologic features of the CHARGE association: support for involvement of the neural crest. *Teratology.* 1985;31: 331–336. doi:10.1002/tera.1420310303
 86. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med.* 1985;313: 837–841. doi:10.1056/NEJM198510033131401
 87. McBride WG. Thalidomide embryopathy. *Teratology.* 1977;16: 79–82. doi:10.1002/tera.1420160113
 88. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2015;105: 140–156. doi:10.1002/bdrc.21096
 89. Clark EB, Hu N. Developmental hemodynamic changes in the chick embryo from stage 18 to 27. *Circ Res.* 1982;51: 810–815. doi:10.1161/01.res.51.6.810
 90. Clark EB. Hemodynamic control of the chick embryo cardiovascular system. *Congenital Heart Disease: Causes and Processes* Mt Kisco, NY, Futura Publishing Co, Inc. 1984; 377–386.

91. Bremer JL. The presence and influence of two spiral streams in the heart of the chick embryo. *Am J Anat.* 1932;49: 409–440. doi:10.1002/aja.1000490305
92. Goerttler K. Glass model experiments of embryonic human hearts. *Cardiac Development with Special Reference to Human Heart Disease* Dayton Press, Dayton, OH. 1970; 29–43.
93. Rychter Z. Experimental Morphology of the Aortic Arches and the Heart Loop in Chick Embryos. In: Abercrombie M, Brachet J, editors. *Advances in Morphogenesis*. Elsevier; 1962. pp. 333–371. doi:10.1016/B978-1-4831-9949-8.50012-2
94. Clark EB. Neck web and congenital heart defects: A pathogenic association in 45 X-O Turner syndrome? *Teratology.* 1984;29: 355–361. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tera.1420290305>
95. Atkins DL, Clark EB, Marvin WJ Jr. Foramen ovale/atrial septum area ratio: a marker of transatrial blood flow. *Circulation.* 1982;66: 281–283. doi:10.1161/01.cir.66.2.281
96. Pexieder T. Cell Death and the Morphogenesis of the Heart. In: Pexieder T, editor. *Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1975. pp. 37–47. doi:10.1007/978-3-642-66142-6_9
97. Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011;91: 535–550. doi:10.1002/bdra.20810
98. Franklin RCG, Jacobs JP, Tchervenkov CI, Béland MJ. Bidirectional crossmap of the Short Lists of the European Paediatric Cardiac Code and the International Congenital Heart Surgery Nomenclature and Database Project. *Cardiology in the Young.* 2002. pp. 18–22. doi:10.1017/s1047951100012221
99. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39: 1890–1900. doi:10.1016/s0735-1097(02)01886-7
100. Botto LD, Lin AE, Riehle-Colarusso T, Malik S, Correa A, National Birth Defects Prevention Study. Seeking causes: Classifying and evaluating congenital heart defects in etiologic studies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79: 714–727. doi:10.1002/bdra.20403
101. Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR, et al. Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat Genet.* 2017;49: 1593–1601. doi:10.1038/ng.3970
102. Houyel L, Khoshnood B, Anderson RH, Lelong N, Thieulin A-C, Goffinet F, et al. Population-based evaluation of a suggested anatomic and clinical classification of congenital heart defects based on the International Paediatric and Congenital Cardiac Code. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6: 64. doi:10.1186/1750-1172-6-64
103. Ellesøe SG, Workman CT, Bouvagnet P, Loffredo CA, McBride KL, Hinton RB, et al. Familial co-occurrence of congenital heart defects follows distinct patterns. *Eur Heart J.* 2018;39: 1015–1022. doi:10.1093/eurheartj/ehx314
104. Brodwall K, Greve G, Leirgul E, Tell GS, Vollset SE, Øyen N. Recurrence of congenital heart defects among siblings—a nationwide study. *Am J Med Genet A.* 2017;173: 1575–1585. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajmg.a.38237>
105. Goenezen S, Rennie MY, Rugonyi S. Biomechanics of early cardiac development. *Biomech Model Mechanobiol.* 2012;11: 1187–1204. doi:10.1007/s10237-012-0414-7
106. Basson CT, Cowley GS, Solomon SD, Weissman B, Poznanski AK, Traill TA, et al. The

- clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *N Engl J Med*. 1994;330: 885–891. doi:10.1056/NEJM199403313301302
107. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res*. 2017;120: 923–940. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309140
 108. Shieh JTC, Bittles AH, Hudgins L. Consanguinity and the risk of congenital heart disease. *Am J Med Genet A*. 2012;158A: 1236–1241. doi:10.1002/ajmg.a.35272
 109. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol*. 2011;32: 1147–1157. doi:10.1007/s00246-011-0034-5
 110. Richards AA, Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev*. 2010;6: 91–97. doi:10.2174/157340310791162703
 111. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res*. 2008;64: 358–363. doi:10.1203/PDR.0b013e31818095d0
 112. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*. 2004;5: 725–738. doi:10.1038/nrg1448
 113. Bondy CA. Turner syndrome 2008. *Horm Res*. 2009;71 Suppl 1: 52–56. doi:10.1159/000178039
 114. Pont SJ, Robbins JM, Bird TM, Gibson JB, Cleves MA, Tilford JM, et al. Congenital malformations among liveborn infants with trisomies 18 and 13. *Am J Med Genet A*. 2006;140: 1749–1756. doi:10.1002/ajmg.a.31382
 115. Wimalasundera RC, Gardiner HM. Congenital heart disease and aneuploidy. *Prenat Diagn*. 2004;24: 1116–1122. doi:10.1002/pd.1068
 116. Grossman TR, Gamliel A, Wessells RJ, Taghli-Lamalle O, Jepsen K, Ocorr K, et al. Over-expression of DSCAM and COL6A2 cooperatively generates congenital heart defects. *PLoS Genet*. 2011;7: e1002344. doi:10.1371/journal.pgen.1002344
 117. Carvalho CMB, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat Rev Genet*. 2016;17: 224–238. doi:10.1038/nrg.2015.25
 118. Devriendt K, Eyskens B, Swillen A, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP. The incidence of a deletion in chromosome 22Q11 in sporadic and familial conotruncal heart disease. *European journal of pediatrics*. 1996. p. 721. doi:10.1007/BF01957162
 119. Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32: 492–498. doi:10.1016/s0735-1097(98)00259-9
 120. Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A*. 2003;116A: 129–135. doi:10.1002/ajmg.a.10832
 121. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, et al. TBX1 Is Responsible for Cardiovascular Defects in Velo-Cardio-Facial/DiGeorge Syndrome. *Cell*. 2001;104: 619–629. doi:10.1016/S0092-8674(01)00247-1

122. Ehrlich L, Prakash SK. Copy-number variation in congenital heart disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2022;77: 101986. doi:10.1016/j.gde.2022.101986
123. Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, Darlay R, Töpf A, Zelenika D, et al. Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet.* 2012;91: 489–501. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.003
124. Andreassi MG, Della Corte A. Genetics of bicuspid aortic valve aortopathy. *Curr Opin Cardiol.* 2016;31: 585–592. doi:10.1097/HCO.0000000000000328
125. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013;112: 707–720. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300853
126. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res.* 2014;115: 884–896. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304458
127. Fahed AC, Roberts AE, Mital S, Lakdawala NK. Heart failure in congenital heart disease: a confluence of acquired and congenital. *Heart Fail Clin.* 2014;10: 219–227. doi:10.1016/j.hfc.2013.09.017
128. Homsy J, Zaidi S, Shen Y, Ware JS, Samocha KE, Karczewski KJ, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science.* 2015;350: 1262–1266. doi:10.1126/science.aac9396
129. Sifrim A, Hitz M-P, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SHA, Thienpont B, et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet.* 2016;48: 1060–1065. doi:10.1038/ng.3627
130. Szot JO, Cuny H, Blue GM, Humphreys DT, Ip E, Harrison K, et al. A Screening Approach to Identify Clinically Actionable Variants Causing Congenital Heart Disease in Exome Data. *Circ Genom Precis Med.* 2018;11: e001978. doi:10.1161/CIRCGEN.117.001978
131. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science.* 1998;281: 108–111. doi:10.1126/science.281.5373.108
132. Muntean I, Togănel R, Benedek T. Genetics of Congenital Heart Disease: Past and Present. *Biochem Genet.* 2017;55: 105–123. doi:10.1007/s10528-016-9780-7
133. Lage K, Greenway SC, Rosenfeld JA, Wakimoto H, Gorham JM, Segrè AV, et al. Genetic and environmental risk factors in congenital heart disease functionally converge in protein networks driving heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109: 14035–14040. doi:10.1073/pnas.1210730109
134. Chaix MA, Andelfinger G, Khairy P. Genetic testing in congenital heart disease: A clinical approach. *World J Cardiol.* 2016;8: 180–191. doi:10.4330/wjc.v8.i2.180
135. Su W, Zhu P, Wang R, Wu Q, Wang M, Zhang X, et al. Congenital heart diseases and their association with the variant distribution features on susceptibility genes. *Clin Genet.* 2017;91: 349–354. doi:10.1111/cge.12835
136. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature.* 2013;498: 220–223. doi:10.1038/nature12141

137. Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Dunwoodie SL, Ho JWK, Hilton DCK, et al. Targeted next-generation sequencing identifies pathogenic variants in familial congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64: 2498–2506. doi:10.1016/j.jacc.2014.09.048
138. Jia Y, Louw JJ, Breckpot J, Callewaert B, Barrea C, Sznajer Y, et al. The diagnostic value of next generation sequencing in familial nonsyndromic congenital heart defects. *Am J Med Genet A*. 2015;167A: 1822–1829. doi:10.1002/ajmg.a.37108
139. Li Y, Klena NT, Gabriel GC, Liu X, Kim AJ, Lemke K, et al. Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*. 2015;521: 520–524. doi:10.1038/nature14269
140. Jiang T, Huang M, Jiang T, Gu Y, Wang Y, Wu Y, et al. Genome-wide compound heterozygosity analysis highlighted 4 novel susceptibility loci for congenital heart disease in Chinese population. *Clin Genet*. 2018;94: 296–302. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cge.13384>
141. Agopian AJ, Goldmuntz E, Hakonarson H, Sewda A, Taylor D, Mitchell LE, et al. Genome-Wide Association Studies and Meta-Analyses for Congenital Heart Defects. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10: e001449. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001449
142. Williams K, Carson J, Lo C. Genetics of Congenital Heart Disease. *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9120879
143. Beghetti M, Tissot C. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart diseases. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009;30: 421–428. doi:10.1055/s-0029-1233311
144. Roberts KE, McElroy JJ, Wong WPK, Yen E, Widlitz A, Barst RJ, et al. BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Eur Respir J*. 2004;24: 371–374. doi:10.1183/09031936.04.00018604
145. Services for the Prevention and Management of Genetic Disorders and Birth Defects in Developing Countries: Report of a Joint WHO/WAOPBD Meeting, The Hague, 5-7 January 1999. World Health Organization, Human Genetics Programme; 1999. Available: <https://play.google.com/store/books/details?id=Mh2rHAAACAAJ>
146. de Salud M. Defunciones de Menores de Cinco Años. Indicadores Seleccionados. Argentina – Año 2012. Available: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin143.pdf>
147. Dirección de Estadísticas e Información de la Salud. 4 Dec 2020 [cited 28 May 2021]. Available: <http://www.deis.msal.gov.ar/wp-content/uploads>
148. DEIS Indicadores Básicos 2014. Available: http://www.deis.msal.gov.ar/wp-content/uploads/2018/04/indicadores_2014.pdf
149. Programa Nacional de Cardiopatías Congénitas (PNCC). [cited 4 Oct 2023]. Available: <https://www.msal.gov.ar/index.php/programas-y-planos/414-programa-nacional-de-cardiopatias-congenitas->
150. Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat*. 2006;27: 814–821. doi:10.1002/humu.20330
151. Antoniadis T, Yapijakis C, Kaminopetros P, Makatsoris C, Velissariou V, Vassilopoulos D, et al. A simple and effective approach for detecting maternal cell contamination in molecular prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 2002;22: 425–429. doi:10.1002/pd.325

152. Lin X, Li H, Liu L, Kong L, Mao Y, Li W, et al. Next generation sequencing as a new detection strategy for maternal cell contamination in clinical prenatal samples. *Ginekol Pol.* 2018;89: 326–334. doi:10.5603/GP.a2018.0056
153. Moretti TR, Moreno LI, Smerick JB, Pignone ML, Hizon R, Buckleton JS, et al. Population data on the expanded CODIS core STR loci for eleven populations of significance for forensic DNA analyses in the United States. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;25: 175–181. doi:10.1016/j.fsigen.2016.07.022
154. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2019;22: 245–257. doi:10.1038/s41436-019-0686-8
155. Desvignes J-P, Bartoli M, Delague V, Krahn M, Miltgen M, Bérout C, et al. VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2018;46: W545–W553. doi:10.1093/nar/gky471
156. Portnoi M-F. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet.* 2009;52: 88–93. doi:10.1016/j.ejmg.2009.02.008
157. Zhu H. Forkhead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease. *Life Sci.* 2016;144: 194–201. doi:10.1016/j.lfs.2015.12.001
158. Cowan JR, Ware SM. Genetics and genetic testing in congenital heart disease. *Clin Perinatol.* 2015;42: 373–93, ix. doi:10.1016/j.clp.2015.02.009
159. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics.* 2015;31: 761–763. doi:10.1093/bioinformatics/btu703
160. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GLA, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat.* 2013;34: 57–65. doi:10.1002/humu.22225
161. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* 2011;39: e118. doi:10.1093/nar/gkr407
162. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11: 361–362. doi:10.1038/nmeth.2890
163. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012;7: e46688. doi:10.1371/journal.pone.0046688
164. Shihab HA, Rogers MF, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day INM, et al. An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation. *Bioinformatics.* 2015. pp. 1536–1543. doi:10.1093/bioinformatics/btv009
165. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4: 1073–1081. doi:10.1038/nprot.2009.86
166. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7: 248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248
167. Richards S, ; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, Aziz N, Bale

- S, Bick D, Das S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015. pp. 405–423. doi:10.1038/gim.2015.30
168. Pejaver V, Byrne AB, Feng B-J, Pagel KA, Mooney SD, Karchin R, et al. Calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for PP3/BP4 criteria. *Am J Hum Genet*. 2022;109: 2163–2177. doi:10.1016/j.ajhg.2022.10.013
 169. Kelly MA, Caleshu C, Morales A, Buchan J, Wolf Z, Harrison SM, et al. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel. *Genet Med*. 2018;20: 351. doi:10.1038/gim.2017.218
 170. Gelb BD, Cavé H, Dillon MW, Gripp KW, Lee JA, Mason-Suares H, et al. ClinGen's RASopathy Expert Panel consensus methods for variant interpretation. *Genet Med*. 2018;20: 1334–1345. doi:10.1038/gim.2018.3
 171. Tavigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, et al. Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med*. 2018;20: 1054–1060. doi:10.1038/gim.2017.210
 172. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37: 564–569. doi:10.1002/humu.22981
 173. Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, et al. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol*. 2014;37: 210–219. doi:10.1590/s1415-47572014000200007
 174. Zuo J-Y, Chen H-X, Liu Z-G, Yang Q, He G-W. Identification and functional analysis of variants of MYH6 gene promoter in isolated ventricular septal defects. *BMC Med Genomics*. 2022;15: 1–12. doi:10.1186/s12920-022-01365-y
 175. Ritter A, Leonard J, Gray C, Izumi K, Levinson K, Nair DR, et al. MYH7 variants cause complex congenital heart disease. *Am J Med Genet A*. 2022;188: 2772–2776. doi:10.1002/ajmg.a.62766
 176. Lambrechts D, Devriendt K, Driscoll DA, Goldmuntz E, Gewillig M, Vlietinck R, et al. Low expression VEGF haplotype increases the risk for tetralogy of Fallot: a family based association study. *J Med Genet*. 2005;42: 519–522. doi:10.1136/jmg.2004.026443
 177. Peters THF, Sharma V, Yilmaz E, Mooi WJ, Bogers AJJC, Sharma HS. DNA microarray and quantitative analysis reveal enhanced myocardial VEGF expression with stunted angiogenesis in human tetralogy of Fallot. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67: 305–316. doi:10.1007/s12013-013-9710-9
 178. Reuter MS, Jobling R, Chaturvedi RR, Manshaei R, Costain G, Heung T, et al. Haploinsufficiency of vascular endothelial growth factor related signaling genes is associated with tetralogy of Fallot. *Genet Med*. 2018;21: 1001–1007. doi:10.1038/s41436-018-0260-9
 179. Tavigian SV, Harrison SM, Boucher KM, Biesecker LG. Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines. *Hum Mutat*. 2020;41: 1734–1737. doi:10.1002/humu.24088

180. Davidsson J, Collin A, Olsson ME, Lundgren J. Deletion of the SCN gene cluster on 2q24. 4 is associated with severe epilepsy: an array-based genotype–phenotype correlation and a comprehensive review of *Epilepsy Res.* 2008. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920121108001277>
181. Krepischi ACV, Knijnenburg J, Bertola DR, Kim CA, Pearson PL, Bijlsma E, et al. Two distinct regions in 2q24.2-q24.3 associated with idiopathic epilepsy: Epilepsy Associated with 2q24 Deletions. *Epilepsia.* 2010;51: 2457–2460. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02742.x
182. Mervis CB, Morris CA, Klein-Tasman BP, Velleman SL, Osborne LR. 7q11.23 Duplication Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, et al., editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2015. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610320>
183. Kloth K, Renner S, Burmester G, Steinemann D, Pabst B, Lorenz B, et al. 16p13.11 microdeletion uncovers loss-of-function of a MYH11 missense variant in a patient with megacystis-microcolon-intestinal-hypoperistalsis syndrome. *Clin Genet.* 2019;96: 85–90. doi:10.1111/cge.13557
184. Ambartsumyan L. Megacystis-Microcolon-Intestinal Hypoperistalsis Syndrome Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, et al., editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2019. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31070878>
185. Forabosco A, Baroncini A, Dalpra L, Chessa L, Giannotti A, Maccagnani F, et al. The phenotype of partial dup(7q) reconsidered: a report of five new cases. *Clin Genet.* 1988;34: 48–59. doi:10.1111/j.1399-0004.1988.tb02615.x
186. Morava E, Bartsch O, Czako M, Frensel A, Kalscheuer V, Kárteszi J, et al. Small inherited terminal duplication of 7q with hydrocephalus, cleft palate, joint contractures, and severe hypotonia. *Clin Dysmorphol.* 2003;12: 123–127. doi:10.1097/01.mcd.0000059768.40218.9b
187. Jordan VK, Zaveri HP, Scott DA. 1p36 deletion syndrome: an update. *Appl Clin Genet.* 2015;8: 189–200. doi:10.2147/TACG.S65698
188. Miranda-Fernández M-C, Ramírez-Oyaga S, Restrepo CM, Huertas-Quiñones V-M, Barrera-Castañeda M, Quero R, et al. Identification of a New Candidate Locus for Ebstein Anomaly in 1p36.2. *Mol Syndromol.* 2018;9: 164–169. doi:10.1159/000488820
189. Erdogan F, Ullmann R, Chen W, Schubert M, Adolph S, Hultschig C, et al. Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome “tiling path” BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. *Am J Med Genet A.* 2007;143A: 172–178. doi:10.1002/ajmg.a.31541
190. Quadri M, Vetro A, Gismondi V, Marabelli M, Bertario L, Sala P, et al. APC rearrangements in familial adenomatous polyposis: heterogeneity of deletion lengths and breakpoint sequences underlies similar phenotypes. *Fam Cancer.* 2015;14: 41–49. doi:10.1007/s10689-014-9750-3
191. Michils G, Tejpar S, Thoelen R, van Cutsem E, Vermeesch JR, Fryns J-P, et al. Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum Mutat.* 2005;25: 125–134. doi:10.1002/humu.20122
192. Williams GM, Brady R. Patau Syndrome. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855930>
193. Eto K, Sakai N, Shimada S, Shioda M, Ishigaki K, Hamada Y, et al. Microdeletions of

- 3p21.31 characterized by developmental delay, distinctive features, elevated serum creatine kinase levels, and white matter involvement. *Am J Med Genet A*. 2013;161A: 3049–3056. doi:10.1002/ajmg.a.36156
194. Haldeman-Englert CR, Gai X, Perin JC, Ciano M, Halbach SS, Geiger EA, et al. A 3.1-Mb microdeletion of 3p21.31 associated with cortical blindness, cleft lip, CNS abnormalities, and developmental delay. *Eur J Med Genet*. 2009;52: 265–268. doi:10.1016/j.ejmg.2008.11.005
 195. Lee JS, Hwang H, Kim SY, Kim KJ, Choi JS, Woo MJ, et al. Chromosomal Microarray With Clinical Diagnostic Utility in Children With Developmental Delay or Intellectual Disability. *Ann Lab Med*. 2018;38: 473–480. doi:10.3343/alm.2018.38.5.473
 196. Lovrecic L, Bertok S, Žerjav Tanšek M. A New Case of an Extremely Rare 3p21.31 Interstitial Deletion. *Mol Syndromol*. 2016;7: 93–98. doi:10.1159/000445227
 197. Yetman AT, Starr LJ. Newly described recessive MYH11 disorder with clinical overlap of Multisystemic smooth muscle dysfunction and Megacystis microcolon hypoperistalsis syndromes. *Am J Med Genet A*. 2018;176: 1011–1014. doi:10.1002/ajmg.a.38647
 198. Yoshida R, Nagai T, Hasegawa T, Kinoshita E, Tanaka T, Ogata T. Two novel and one recurrentPTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 2004. pp. 432–434. doi:10.1002/ajmg.a.30281
 199. Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem*. 2006;281: 6785–6792. doi:10.1074/jbc.M513068200
 200. Kitsiou-Tzeli S, Papadopoulou A, Kanaka-Gantenbein C, Fretzayas A, Daskalopoulos D, Kanavakis E, et al. Does the rare A172G mutation of PTPN11 gene convey a mild Noonan syndrome phenotype? *Horm Res*. 2006;66: 124–131. doi:10.1159/000094145
 201. Fergelot P, Van Belzen M, Van Gils J, Afenjar A, Armour CM, Arveiler B, et al. Phenotype and genotype in 52 patients with Rubinstein-Taybi syndrome caused by EP300 mutations. *Am J Med Genet A*. 2016;170: 3069–3082. doi:10.1002/ajmg.a.37940
 202. Menke LA, Gardeitchik T, Hammond P, Heimdal KR, Houge G, Hufnagel SB, et al. Further delineation of an entity caused by CREBBP and EP300 mutations but not resembling Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176: 862–876. doi:10.1002/ajmg.a.38626
 203. Stevens CA. Rubinstein-Taybi Syndrome Synonym: Broad Thumb-Hallux Syndrome. *Gene*. Available: <https://europepmc.org/books/n/gene/rsts/?extid=32239881&src=med>
 204. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 2002;70: 1555–1563. doi:10.1086/340847
 205. Strullu M, Caye A, Lachenaud J, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, et al. Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. *J Med Genet*. 2014;51: 689–697. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102611
 206. Joyce S, Gordon K, Brice G, Ostergaard P, Nagaraja R, Short J, et al. The lymphatic phenotype in Noonan and Cardiofaciocutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2016;24: 690–696. doi:10.1038/ejhg.2015.175
 207. van Trier DC, Vos AMC, Draaijer RW, van der Burgt I, Draaisma JMT, Cruysberg JRM.

- Ocular Manifestations of Noonan Syndrome: A Prospective Clinical and Genetic Study of 25 Patients. *Ophthalmology*. 2016;123: 2137–2146. doi:10.1016/j.ophtha.2016.06.061
208. Mendez R, Delea M, Dain L, Rittler M. A novel pathogenic frameshift variant of KAT6B identified by clinical exome sequencing in a newborn with the Say–Barber–Biesecker–Young–Simpson syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2020;29: 42. doi:10.1097/MCD.0000000000000270
 209. Grunert M, Dorn C, Schueler M, Dunkel I, Schlesinger J, Mebus S, et al. Rare and private variations in neural crest, apoptosis and sarcomere genes define the polygenic background of isolated Tetralogy of Fallot. *Hum Mol Genet*. 2014;23: 3115–3128. doi:10.1093/hmg/ddu021
 210. Fiorillo C, Astrea G, Savarese M, Cassandrini D, Brisca G, Trucco F, et al. MYH7-related myopathies: clinical, histopathological and imaging findings in a cohort of Italian patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11: 91. doi:10.1186/s13023-016-0476-1
 211. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, et al. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat*. 2010;31: 284–294. doi:10.1002/humu.21187
 212. Komissarova SM, Rineiska NM, Chakova NN, Niyazova SS. [Overlapping Phenotype: Left Ventricular non-Compaction and Hypertrophic Cardiomyopathy]. *Kardiologiya*. 2020;60: 137–145. doi:10.18087/cardio.2020.4.n728
 213. Zhu M, Wang Y, Guan L, Lu C, Sun R, Chen Y, et al. A novel chromosome 2q24.3-q32.1 microdeletion in a fetus with multiple malformations. *J Clin Lab Anal*. 2022;36: e24602. doi:10.1002/jcla.24602
 214. Gauthier J, Ouled Amar Bencheikh B, Hamdan FF, Harrison SM, Baker LA, Couture F, et al. A homozygous loss-of-function variant in MYH11 in a case with megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2015;23: 1266–1268. doi:10.1038/ejhg.2014.256
 215. Wang Q, Zhang J, Wang H, Feng Q, Luo F, Xie J. Compound heterozygous variants in MYH11 underlie autosomal recessive megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome in a Chinese family. *J Hum Genet*. 2019;64: 1067–1073. doi:10.1038/s10038-019-0651-z
 216. Nagamani SCS, Erez A, Bader P, Lalani SR, Scott DA, Scaglia F, et al. Phenotypic manifestations of copy number variation in chromosome 16p13.11. *Eur J Hum Genet*. 2011;19: 280–286. doi:10.1038/ejhg.2010.184
 217. Ingason A, Rujescu D, Cichon S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Pietiläinen OPH, et al. Copy number variations of chromosome 16p13.1 region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2011;16: 17–25. doi:10.1038/mp.2009.101
 218. Shields K, Northrup H. P304: Fifth case of MYH11-associated megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome identified in patient with missense variant and whole gene *Genetics in Medicine Open*. 2023. Available: [https://www.gimopen.org/article/S2949-7744\(23\)00332-1/abstract](https://www.gimopen.org/article/S2949-7744(23)00332-1/abstract)
 219. Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, van de Laar IMBM, Martens L, et al. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Eur J Hum Genet*. 2013;21: 936–942. doi:10.1038/ejhg.2012.285
 220. Ye B, Hou N, Xiao L, Xu Y, Boyer J, Xu H, et al. APC controls asymmetric Wnt/β-catenin

- signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.018
221. Stevens CA. Rubinstein-Taybi Syndrome. University of Washington, Seattle; 2019. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1526/>
 222. Zimmermann N, Acosta AMBF, Kohlhase J, Bartsch O. Confirmation of EP300 gene mutations as a rare cause of Rubinstein-Taybi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15: 837–842. doi:10.1038/sj.ejhg.5201791
 223. López M, Seidel V, Santibáñez P, Cervera-Acedo C, Castro-de Castro P, Domínguez-Garrido E. First case report of inherited Rubinstein-Taybi syndrome associated with a novel EP300 variant. *BMC Med Genet.* 2016;17: 97. doi:10.1186/s12881-016-0361-8
 224. Vlckova M, Simandlova M, Zimmermann P, Stranecky V, Hartmannova H, Hodanova K, et al. A patient showing features of both SBBYSS and GPS supports the concept of a KAT6B-related disease spectrum, with mutations in mid-exon 18 possibly leading to combined phenotypes. *Eur J Med Genet.* 2015;58: 550–555. doi:10.1016/j.ejmg.2015.09.004
 225. Radvanszky J, Hyblova M, Durovcikova D, Hikkelova M, Fiedler E, Kadasi L, et al. Complex phenotypes blur conventional borders between Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson syndrome and genitopatellar syndrome. *Clin Genet.* 2017;91: 339–343. doi:10.1111/cge.12840
 226. KAT6B-Related Disorders. In: National Organization for Rare Disorders [Internet]. 13 Mar 2023 [cited 19 Sep 2023]. Available: <https://rarediseases.org/rare-diseases/kat6b-related-disorders/>
 227. García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Álvarez V, Alonso B, et al. Mutations in Sarcomeric Genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition).* 2009;62: 48–56. doi:10.1016/S1885-5857(09)71513-0
 228. Coto E, Palacín M, Martín M, Castro MG, Reguero JR, García C, et al. Functional polymorphisms in genes of the Angiotensin and Serotonin systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: AT1R as a potential modifier. *J Transl Med.* 2010;8. doi:10.1186/1479-5876-8-64
 229. Sanchez O, Campuzano O, Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Cesar S, Mademont I, et al. Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation. *PLoS One.* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0167358
 230. Gómez J, Lorca R, Reguero JR, Morís C, Martín M, Tranche S, et al. Screening of the *Filamin C* Gene in a Large Cohort of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients. *Circulation: Cardiovascular Genetics.* 2017. doi:10.1161/circgenetics.116.001584
 231. Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Tugrul OF, Lai A, Amr A, Haas J, et al. Clinical outcomes associated with sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis on 7675 individuals. *Clin Res Cardiol.* 2018;107. doi:10.1007/s00392-017-1155-5
 232. Wang L, Geist J, Grogan A, Hu LR, Kontogianni-Konstantopoulos A. Thick Filament Protein Network, Functions, and Disease Association. *Compr Physiol.* 2018;8. doi:10.1002/cphy.c170023
 233. Sanchez O, Campuzano O, Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Cesar S, Mademont I, et al. Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation. *PLoS One.* 2016;11: e0167358. doi:10.1371/journal.pone.0167358

234. Ethics. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 y TPM1 en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. [cited 12 May 2023]. Available: <http://www.revespcardiol.org/en-linkresolver-espectro-mutacional-genes-sarcomericos-myh7-13131359>
235. García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Álvarez V, Alonso B, et al. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 y TPM1 en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62: 48–56. doi:10.1016/s0300-8932(09)70020-x
236. Konersman CG, Freyermuth F, Winder TL, Lawlor MW, Lagier-Tourenne C, Patel SB. Novel autosomal dominant TNNT1 mutation causing nemaline myopathy. *Mol Genet Genomic Med*. 2017;5: 678–691. doi:10.1002/mgg3.325
237. Chen C-P, Hsu C-Y, Chern S-R, Wu P-S, Chen S-W, Wu F-T, et al. Prenatal diagnosis of a 1.651-Mb 19q13.42-q13.43 microdeletion in a fetus with micrognathia and bilateral pyelectasis on prenatal ultrasound. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2020;59: 763–765. doi:10.1016/j.tjog.2020.07.025
238. Streff H, Bi W, Colón AG, Adesina AM, Miyake CY, Lalani SR. Amish nemaline myopathy and dilated cardiomyopathy caused by a homozygous contiguous gene deletion of TNNT1 and TNNI3 in a Mennonite child. *Eur J Med Genet*. 2019;62: 103567. doi:10.1016/j.ejmg.2018.11.001
239. Działo E, Czepiel M, Tkacz K, Siedlar M, Kania G, Błyszczuk P. WNT/ β -Catenin Signaling Promotes TGF- β -Mediated Activation of Human Cardiac Fibroblasts by Enhancing IL-11 Production. *Int J Mol Sci*. 2021;22. doi:10.3390/ijms221810072
240. Avasthi KK, Muthuswamy S, Asim A, Agarwal A, Agarwal S. Identification of Novel Genomic Variations in Susceptibility to Nonsyndromic Cleft Lip and Palate Patients. *Pediatr Rep*. 2021;13: 650–657. doi:10.3390/pediatric13040077
241. Franklin. [cited 12 May 2023]. Available: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/variant/snp/chr14-23900855-T-A?app=gene-assessment>
242. Vepsäläinen T, Heliö T, Vasilescu C, Martelius L, Weckström S, Koskenvuo J, et al. MYH7 Genotype–Phenotype Correlation in a Cohort of Finnish Patients. *Cardiogenetics*. 2022;12: 122–132. doi:10.3390/cardiogenetics12010013
243. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2007;39: 1007–1012. doi:10.1038/ng2073
244. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy JG, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res*. 2014;115: 884–896. Available: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/circresaha.115.304458>
245. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet*. 2009;84: 524–533. doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.010
246. Al-Dewik N, Mohd H, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, Mahmoud L, et al. Clinical exome sequencing in 509 Middle Eastern families with suspected Mendelian diseases: The Qatari experience. *Am J Med Genet A*. 2019;179: 927–935. doi:10.1002/ajmg.a.61126

247. O'Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*. 2012;338: 1619–1622. doi:10.1126/science.1227764
248. Turner TN, Wilfert AB, Bakken TE, Bernier RA, Pepper MR, Zhang Z, et al. Sex-Based Analysis of De Novo Variants in Neurodevelopmental Disorders. *Am J Hum Genet*. 2019;105: 1274–1285. doi:10.1016/j.ajhg.2019.11.003
249. Jelly blocks that send a message. *Nature*. 2018;554: 9. doi:10.1038/d41586-018-01139-6
250. Luscan A, Laurendeau I, Malan V, Francannet C, Odent S, Giuliano F, et al. Mutations in SETD2 cause a novel overgrowth condition. *J Med Genet*. 2014;51: 512–517. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102402
251. van Rij MC, Hollink IHIM, Terhal PA, Kant SG, Ruivenkamp C, van Haeringen A, et al. Two novel cases expanding the phenotype of SETD2-related overgrowth syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176: 1212–1215. doi:10.1002/ajmg.a.38666
252. Marzin P, Rondeau S, Aldinger KA, Alessandri J-L, Isidor B, Heron D, et al. SETD2 related overgrowth syndrome: Presentation of four new patients and review of the literature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2019;181: 509–518. doi:10.1002/ajmg.c.31746
253. Iglesias A, Anyane-Yeboah K, Wynn J, Wilson A, Truitt Cho M, Guzman E, et al. The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. *Genet Med*. 2014;16: 922–931. doi:10.1038/gim.2014.58
254. Wang T, Hoekzema K, Vecchio D, Wu H, Sulovari A, Coe BP, et al. Large-scale targeted sequencing identifies risk genes for neurodevelopmental disorders. *Nat Commun*. 2020;11: 4932. doi:10.1038/s41467-020-18723-y
255. Hosseini SA, Labilloy A. Genetics, TREX1 Mutations. StatPearls Publishing; 2022. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544289/>
256. Towbin JA, Jefferies JL, Ryan TD. 154 - Pathophysiology of Cardiomyopathies. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, editors. *Fetal and Neonatal Physiology* (Fifth Edition). Elsevier; 2017. pp. 1563–1575.e4. doi:10.1016/B978-0-323-35214-7.00154-2
257. Olson TM, Karst ML, Whitby FG, Driscoll DJ. Myosin light chain mutation causes autosomal recessive cardiomyopathy with mid-cavitary hypertrophy and restrictive physiology. *Circulation*. 2002;105: 2337–2340. doi:10.1161/01.cir.0000018444.47798.94
258. Caleshu C, Sakhuja R, Nussbaum RL, Schiller NB, Ursell PC, Eng C, et al. Furthering the link between the sarcomere and primary cardiomyopathies: restrictive cardiomyopathy associated with multiple mutations in genes previously associated with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Med Genet A*. 2011;155A: 2229–2235. doi:10.1002/ajmg.a.34097
259. Andersen PS, Havndrup O, Hougs L, Sørensen KM, Jensen M, Larsen LA, et al. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Hum Mutat*. 2009;30: 363–370. doi:10.1002/humu.20862
260. Wang J, Wang Y, Zou Y, Sun K, Wang Z, Ding H, et al. Malignant effects of multiple rare variants in sarcomere genes on the prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2014;16: 950–957. doi:10.1002/ehf.144
261. Lossie J, Ushakov DS, Ferenczi MA, Werner S, Keller S, Haase H, et al. Mutations of

- ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. *Cardiovasc Res.* 2012;93: 390–396. doi:10.1093/cvr/cvr320
262. Osborn DPS, Emrahi L, Clayton J, Tabrizi MT, Wan AYB, Maroofian R, et al. Autosomal recessive cardiomyopathy and sudden cardiac death associated with variants in MYL3. *Genet Med.* 2021;23: 787–792. doi:10.1038/s41436-020-01028-2
263. Scott CA, Marsden AN, Rebagliati MR, Zhang Q, Chamling X, Searby CC, et al. Nuclear/cytoplasmic transport defects in BBS6 underlie congenital heart disease through perturbation of a chromatin remodeling protein. *PLoS Genet.* 2017;13: e1006936. doi:10.1371/journal.pgen.1006936
264. Gonzalez-Teran B, Pittman M, Felix F, Richmond-Buccola D, Thomas R, Choudhary K, et al. Integration of Protein Interactome Networks with Congenital Heart Disease Variants Reveals Candidate Disease Genes. *bioRxiv.* 2021. p. 2021.01.05.423837. doi:10.1101/2021.01.05.423837
265. Kim JK, Huh SO, Choi H, Lee KS, Shin D, Lee C, et al. Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development. *Mol Cell Biol.* 2001;21: 7787–7795. doi:10.1128/MCB.21.22.7787-7795.2001
266. Sun F, Tang F, Yan AY, Fang HY, Sheng HZ. Expression of SRG3, a chromatin-remodelling factor, in the mouse oocyte and early preimplantation embryos. *Zygote.* 2007;15: 129–138. doi:10.1017/S096719940600400X
267. Ververi A, Splitt M, Dean JCS, DDD Study, Brady AF. Phenotypic spectrum associated with de novo mutations in QRIC1 gene. *Clin Genet.* 2018;93: 286–292. doi:10.1111/cge.13096
268. Lui JC, Jee YH, Lee A, Yue S, Wagner J, Donnelly DE, et al. QRIC1 mutations cause a chondrodysplasia with developmental delay. *Clin Genet.* 2019;95: 160–164. doi:10.1111/cge.13457
269. Föhrenbach M, Jamra RA, Borkhardt A, Brozou T, Muschke P, Popp B, et al. QRIC1 variants in Ververi-Brady syndrome-delineation of the genotypic and phenotypic spectrum. *Clin Genet.* 2021;99: 199–207. doi:10.1111/cge.13853
270. Journal of Investigative Medicine. In: SAGE Publications Inc [Internet]. 10 Sep 2022 [cited 7 Sep 2023]. Available: <https://jim.bmj.com/content/68/1/91>
271. Groisman B, Bidondo MP, Barbero P, Gili JA, Liascovich R, RENAC Task Force. RENAC: National Registry of Congenital Anomalies of Argentina. *Arch Argent Pediatr.* 2013;111: 484–494. doi:10.5546/aap.2013.484
272. Agergaard P, Olesen C, Østergaard JR, Christiansen M, Sørensen KM. The prevalence of chromosome 22q11.2 deletions in 2,478 children with cardiovascular malformations. A population-based study. *Am J Med Genet A.* 2012;158A: 498–508. doi:10.1002/ajmg.a.34250
273. Barisić I, Morozin Pohovski L, Petković I, Cvetko Z, Stipanić G, Bagatin M. Screening of patients at risk for 22q11 deletion. *Coll Antropol.* 2008;32: 165–169. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494202>
274. Campos CMR, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104: 24–31. doi:10.5935/abc.20140169
275. Warburton D, Ronemus M, Kline J, Jobanputra V, Williams I, Anyane-Yeboah K, et al. The

- contribution of de novo and rare inherited copy number changes to congenital heart disease in an unselected sample of children with conotruncal defects or hypoplastic left heart disease. *Human Genetics*. 2014. pp. 11–27. doi:10.1007/s00439-013-1353-9
276. 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: 364. doi:10.1186/s12864-015-1590-5
 277. Bretelle F, Beyer L, Pellissier MC, Missirian C, Sigaudy S, Gamberre M, et al. Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet*. 2010;53: 367–370. doi:10.1016/j.ejmg.2010.07.008
 278. 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;29: 433–440. doi:10.1002/humu.20640
 279. Sørensen KM, El-Segaier M, Fernlund E, Errami A, Bouvagnet P, Nehme N, et al. Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: Early diagnosis of syndromic patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012. pp. 720–725. doi:10.1002/ajmg.a.35214
 280. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tümer Z, Tommerup N, Chen W, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet*. 2008;45: 704–709. doi:10.1136/jmg.2008.058776
 281. Goldmuntz E. 22q11.2 deletion syndrome and congenital heart disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2020;184: 64–72. doi:10.1002/ajmg.c.31774
 282. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*. 1997;34: 798–804. doi:10.1136/jmg.34.10.798
 283. Putotto C, Pugnali F, Unolt M, Maiolo S, Trezzi M, Digilio MC, et al. 22q11.2 Deletion Syndrome: Impact of Genetics in the Treatment of Conotruncal Heart Defects. *Children*. 2022;9. doi:10.3390/children9060772
 284. Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, et al. TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One*. 2014;9: e91598. doi:10.1371/journal.pone.0091598
 285. Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A, et al. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 7729–7734. doi:10.1073/pnas.0600206103
 286. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, Koch A, Zink S, Trautmann U, et al. Comprehensive genotype–phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *J Med Genet*. 2010;47: 321–331. doi:10.1136/jmg.2009.070391
 287. Chen M, Yang YS, Shih JC, Lin WH, Lee DJ, Lin YS, et al. Microdeletions/duplications involving TBX1 gene in fetuses with conotruncal heart defects which are negative for 22q11.2 deletion on fluorescence in-situ hybridization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43. doi:10.1002/uog.12550

288. Aguayo-Gómez A, Arteaga-Vázquez J, Svyryd Y, Calderón-Colmenero J, Zamora-González C, Vargas-Alarcón G, et al. Identification of Copy Number Variations in Isolated Tetralogy of Fallot. *Pediatr Cardiol*. 2015;36. doi:10.1007/s00246-015-1210-9
289. Bruno DL, Anderlid B-M, Lindstrand A, van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, et al. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet*. 2010;47: 299–311. doi:10.1136/jmg.2009.069906
290. Greenberg F, Courtney KB, Wessels RA, Huhta J, Carpenter RJ, Rich DC, et al. Prenatal diagnosis of deletion 17p13 associated with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet*. 1988;31: 1–4. doi:10.1002/ajmg.1320310102
291. Mak CCY, Chow PC, Liu APY, Chan KYK, Chu YWY, Mok GTK, et al. De novo large rare copy-number variations contribute to conotruncal heart disease in Chinese patients. *NPJ Genomic Medicine*. 2016;1: 16033. doi:10.1038/npjgenmed.2016.33
292. Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME. Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genet*. 2010;6: e1001154. doi:10.1371/journal.pgen.1001154
293. Silversides CK, Lionel AC, Costain G, Merico D, Migita O, Liu B, et al. Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet*. 2012;8: e1002843. doi:10.1371/journal.pgen.1002843
294. Chen C-P, Liu Y-P, Lin S-P, Chen M, Tsai F-J, Chen Y-T, et al. Ventriculomegaly, intrauterine growth restriction, and congenital heart defects as salient prenatal sonographic findings of Miller-Dieker lissencephaly syndrome associated with monosomy 17p (17p13.2 -->pter) in a fetus. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2010;49: 81–86. doi:10.1016/S1028-4559(10)60015-0
295. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J*. 2007;28: 2778–2784. doi:10.1093/eurheartj/ehl560
296. Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, et al. Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res*. 2011;135: 251–259. doi:10.1159/000331272
297. Findley TO, Crain AK, Mahajan S, Deniwar A, Davis J, Solis Zavala AS, et al. Congenital heart defects and copy number variants associated with neurodevelopmental impairment. *Am J Med Genet A*. 2022;188: 13–23. doi:10.1002/ajmg.a.62484
298. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med*. 2012;367: 1321–1331. doi:10.1056/NEJMoa1200395
299. Serra A, Arpaia E, Bova R. Kinetics of 21-trisomic lymphocytes. I. In vitro response of 21-trisomic lymphocytes to PHA. *Hum Genet*. 1978;41: 157–167. doi:10.1007/BF00273097
300. Hulley BJ, Hummel M, Cook LL, Boyd BK, Wenger SL. Trisomy 8 mosaicism: selective growth advantage of normal cells vs. growth disadvantage of trisomy 8 cells. *Am J Med Genet A*. 2003;116A: 144–146. doi:10.1002/ajmg.a.10651
301. Tsai M-C, Cheng H-Y, Su M-T, Chen M, Kuo P-L. Partial trisomy 8 mosaicism not detected by cultured amniotic-fluid cells. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014;53: 598–601. doi:10.1016/j.tjog.2014.06.003

302. Ushijima K, Yatsuga S, Matsumoto T, Nakamura A, Fukami M, Kagami M. A severely short-statured girl with 47,XX, + 14/46,XX,upd(14)mat, mosaicism. *J Hum Genet.* 2018;63: 377–381. doi:10.1038/s10038-017-0381-z
303. Nimmakayalu M, Noble N, Horton VK, Willing M, Copeland S, Sheffield V, et al. 2q24 deletions: further characterization of clinical findings and their relation to the SCN cluster. *Am J Med Genet A.* 2012;158A: 2767–2774. doi:10.1002/ajmg.a.35362
304. Pescucci C, Caselli R, Grosso S, Mencarelli MA, Mari F, Farnetani MA, et al. 2q24–q31 Deletion: Report of a case and review of the literature. *Eur J Med Genet.* 2007;50: 21–32. doi:10.1016/j.ejmg.2006.09.001
305. Elliott AM, Evans JA. The association of split hand foot malformation (SHFM) and congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008;82: 425–434. doi:10.1002/bdra.20452
306. Gordon CT, Brinas IML, Rodda FA, Bendall AJ, Farlie PG. Role of Dlx genes in craniofacial morphogenesis: Dlx2 influences skeletal patterning by inducing ectomesenchymal aggregation in ovo. *Evol Dev.* 2010;12: 459–473. doi:10.1111/j.1525-142X.2010.00432.x
307. Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, et al. Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development.* 1999;126: 3831–3846. doi:10.1242/dev.126.17.3831
308. Zhao Z, Stock D, Buchanan A, Weiss K. Expression of Dlx genes during the development of the murine dentition. *Dev Genes Evol.* 2000;210: 270–275. doi:10.1007/s004270050314
309. Kim K-S, Arima Y, Kitazawa T, Nishiyama K, Asai R, Uchijima Y, et al. Endothelin regulates neural crest deployment and fate to form great vessels through Dlx5/Dlx6-independent mechanisms. *Mech Dev.* 2013;130: 553–566. doi:10.1016/j.mod.2013.07.005
310. Page DJ, Miossec MJ, Williams SG, Monaghan RM, Fotiou E, Cordell HJ, et al. Whole Exome Sequencing Reveals the Major Genetic Contributors to Nonsyndromic Tetralogy of Fallot. *Circ Res.* 2019;124: 553–563. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313250
311. Nwaze CE, Adebayo O, Adeoye AM, Akinmoladun V. OROFACIAL CLEFTS AND CARDIOVASCULAR RISK AND DISEASES: THE CAUSAL RELATIONSHIP AND ASSOCIATIONS. *Ann Ib Postgrad Med.* 2020;18: S28–S34. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33071693>
312. Jeong J, Li X, McEvilly RJ, Rosenfeld MG, Lufkin T, Rubenstein JLR. Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs. *Development.* 2008;135: 2905–2916. doi:10.1242/dev.019778
313. Jeong J, Cesario J, Zhao Y, Burns L, Westphal H, Rubenstein JLR. Cleft palate defect of Dlx1/2–/– mutant mice is caused by lack of vertical outgrowth in the posterior palate. *Dev Dyn.* 2012;241: 1757–1769. doi:10.1002/dvdy.23867
314. Gaczowska A, Hozyasz K, Wójcicki P, Biedziak B, Jagodziński P, Mostowska A. Polymorphic variants in the DLX1 gene and the risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *J Med Sci.* 2016; 7–14. doi:10.20883/jms.2016.1
315. Fontanella F, Maggio L, Verheij JBGM, Duin LK, Adama Van Scheltema PN, Cohen-Overbeek TE, et al. Fetal megacystis: a lot more than LUTO. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53: 779–787. doi:10.1002/uog.19182
316. Renard M, Callewaert B, Baetens M, Campens L, MacDermot K, Fryns J-P, et al. Novel

- MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGF β signaling in FTAAD. *Int J Cardiol.* 2013;165: 314–321. doi:10.1016/j.ijcard.2011.08.079
317. Meuwissen MEC, Lequin MH, Bindels-de Heus K, Bruggenwirth HT, Knapen MFCM, Dalinghaus M, et al. ACTA2 mutation with childhood cardiovascular, autonomic and brain anomalies and severe outcome. *Am J Med Genet A.* 2013;161A: 1376–1380. doi:10.1002/ajmg.a.35858
318. Regalado ES, Mellor-Crummey L, De Backer J, Braverman AC, Ades L, Benedict S, et al. Clinical history and management recommendations of the smooth muscle dysfunction syndrome due to ACTA2 arginine 179 alterations. *Genet Med.* 2018;20: 1206–1215. doi:10.1038/gim.2017.245
319. van den Bersselaar LM, Verhagen JMA, Bekkers JA, Kempers M, Houweling AC, Baars M, et al. Expanding the genetic and phenotypic spectrum of ACTA2-related vasculopathies in a Dutch cohort. *Genet Med.* 2022;24: 2112–2122. doi:10.1016/j.gim.2022.07.009
320. Capra AP, La Rosa MA, Briguori S, Civa R, Passarelli C, Agolini E, et al. Coexistence of Genetic Diseases Is a New Clinical Challenge: Three Unrelated Cases of Dual Diagnosis. *Genes .* 2023;14. doi:10.3390/genes14020484
321. Zhu Y, Wang Z, Li Y, Peng H, Liu J, Zhang J, et al. The Role of CREBBP/EP300 and Its Therapeutic Implications in Hematological Malignancies. *Cancers .* 2023;15. doi:10.3390/cancers15041219
322. Lavery WJ, Barski A, Wiley S, Schorry EK, Lindsley AW. KMT2C/D COMPASS complex-associated diseases [KCDCCOM-ADs]: an emerging class of congenital regulopathies. *Clin Epigenetics.* 2020;12: 10. doi:10.1186/s13148-019-0802-2
323. Furey CG, Choi J, Jin SC, Zeng X, Timberlake AT, Nelson-Williams C, et al. De Novo Mutation in Genes Regulating Neural Stem Cell Fate in Human Congenital Hydrocephalus. *Neuron.* 2018;99: 302–314.e4. doi:10.1016/j.neuron.2018.06.019
324. Chromosome 1p36 Deletion Syndrome: Prenatal Diagnosis, Molecular Cytogenetic Characterization and Fetal Ultrasound Findings. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2010;49: 473–480. doi:10.1016/S1028-4559(10)60100-3
325. Mohamed AM, Kamel A, Mahmoud W, Abdelraouf E, Meguid N. Intellectual disability secondary to a 16p13 duplication in a 1;16 translocation. Extended phenotype in a four-generation family. *Am J Med Genet A.* 2015;167A. doi:10.1002/ajmg.a.36834
326. Fitzgibbon GJ, Clayton-Smith J, Banka S, Hamilton SJ, Needham MM, Dore JK, et al. Array comparative genomic hybridisation-based identification of two imbalances of chromosome 1p in a 9-year-old girl with a monosomy 1p36 related phenotype and a family history of learning difficulties: a case report. *J Med Case Rep.* 2008;2: 355. doi:10.1186/1752-1947-2-355
327. Corden B, Adami E, Sweeney M, Schafer S, Cook SA. IL-11 in cardiac and renal fibrosis: Late to the party but a central player. *Br J Pharmacol.* 2020;177: 1695–1708. doi:10.1111/bph.15013
328. Harvey RP. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol.* 1996;178: 203–216. doi:10.1006/dbio.1996.0212
329. Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 8145–8149. doi:10.1073/pnas.90.17.8145

330. Kolomenski JE, Delea M, Simonetti L, Fabbro MC, Espeche LD, Taboas M, et al. An update on genetic variants of the NKX2-5. *Hum Mutat.* 2020;41: 1187–1208. doi:10.1002/humu.24030
331. Ouyang P, Saarel E, Bai Y, Luo C, Lv Q, Xu Y, et al. A de novo mutation in NKX2.5 associated with atrial septal defects, ventricular noncompaction, syncope and sudden death. *Clin Chim Acta.* 2011;412: 170–175. doi:10.1016/j.cca.2010.09.035
332. Reamon-Buettner SM, Sattlegger E, Ciribilli Y, Inga A, Wessel A, Borlak J. Transcriptional Defect of an Inherited NKX2-5 Haplotype Comprising a SNP, a Nonsynonymous and a Synonymous Mutation, Associated with Human Congenital Heart Disease. *PLoS ONE.* 2013. p. e83295. doi:10.1371/journal.pone.0083295
333. Mone F, Eberhardt RY, Morris RK, Hurles ME, McMullan DJ, Maher ER, et al. COngenital heart disease and the Diagnostic yield with Exome sequencing (CODE) study: prospective cohort study and systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2021;57: 43–51. doi:10.1002/uog.22072
334. Calcagni G, Limongelli G, D'Ambrosio A, Gesualdo F, Digilio MC, Baban A, et al. Cardiac defects, morbidity and mortality in patients affected by RASopathies. CARNET study results. *Int J Cardiol.* 2017;245: 92–98. doi:10.1016/j.ijcard.2017.07.068
335. Szakszon K, Salpietro C, Kakar N, Knecht AC, Oláh É, Dallapiccola B, et al. De novo mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase KAT6B in two patients with Say-Barber/Biesecker/Young-Simpson syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161A: 884–888. doi:10.1002/ajmg.a.35848
336. Clayton-Smith J, O'Sullivan J, Daly S, Bhaskar S, Day R, Anderson B, et al. Whole-exome-sequencing identifies mutations in histone acetyltransferase gene KAT6B in individuals with the Say-Barber-Biesecker variant of Ohdo syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011;89: 675–681. doi:10.1016/j.ajhg.2011.10.008
337. Lemire G, Campeau PM, Lee BH. KAT6B Disorders. University of Washington, Seattle; 2020. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114806/>
338. Yu H-C, Geiger EA, Medne L, Zackai EH, Shaikh TH. An individual with blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES) and additional features expands the phenotype associated with mutations in KAT6B. *Am J Med Genet A.* 2014;164A: 950–957. doi:10.1002/ajmg.a.36379
339. Gannon T, Perveen R, Schlecht H, Ramsden S, Anderson B, Kerr B, et al. Further delineation of the KAT6B molecular and phenotypic spectrum. *Eur J Hum Genet.* 2015;23: 1165–1170. doi:10.1038/ejhg.2014.248
340. Niida Y, Mitani Y, Kuroda M, Yokoi A, Nakagawa H, Kato A. A Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson variant of Ohdo syndrome with a KAT6B 10-base pair palindromic duplication: A recurrent mutation causing a severe phenotype mixed with genitopatellar syndrome. *Congenit Anom.* 2017;57: 86–88. doi:10.1111/cga.12196
341. Gifford CA, Ranade SS, Samarakoon R, Salunga HT, de Soysa TY, Huang Y, et al. Oligogenic inheritance of a human heart disease involving a genetic modifier. *Science.* 2019;364: 865. doi:10.1126/science.aat5056
342. Gelb BD, Chung WK. Complex Genetics and the Etiology of Human Congenital Heart Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4. doi:10.1101/cshperspect.a013953
343. Pittman M, Lee K, Srivastava D, Pollard KS. An oligogenic inheritance test detects risk genes

and their interactions in congenital heart defects and developmental comorbidities. *bioRxiv*. 2022. p. 2022.04.08.487704. doi:10.1101/2022.04.08.487704

344. Kousi M, Katsanis N. Genetic Modifiers and Oligogenic Inheritance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5. doi:10.1101/cshperspect.a017145
345. Tudurachi B-S, Zăvoi A, Leonte A, Țăpoi L, Ureche C, Bîrgoan SG, et al. An Update on MYBPC3 Gene Mutation in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*. 2023;24. doi:10.3390/ijms241310510
346. Basu R, Hazra S, Shanks M, Paterson DI, Oudit GY. Novel mutation in exon 14 of the sarcomere gene MYH7 in familial left ventricular noncompaction with bicuspid aortic valve. *Circ Heart Fail*. 2014;7: 1059–1062. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001666
347. van der Linde IHM, Hiemstra YL, Bökenkamp R, van Mil AM, Breuning MH, Ruivenkamp C, et al. A Dutch MYH7 founder mutation, p.(Asn1918Lys), is associated with early onset cardiomyopathy and congenital heart defects. *Neth Heart J*. 2017;25: 675–681. doi:10.1007/s12471-017-1037-5
348. Ching Y-H, Ghosh TK, Cross SJ, Packham EA, Honeyman L, Loughna S, et al. Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet*. 2005;37: 423–428. doi:10.1038/ng1526
349. Postma AV, van Engelen K, van de Meerakker J, Rahman T, Probst S, Baars MJH, et al. Mutations in the sarcomere gene MYH7 in Ebstein anomaly. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4: 43–50. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.957985
350. Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X, Rodríguez I, Dumont C, Cazón L, et al. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *Eur Heart J*. 2007;28: 1953–1961. doi:10.1093/eurheartj/ehm239
351. Matsson H, Eason J, Bookwalter CS, Klar J, Gustavsson P, Sunnegårdh J, et al. Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Hum Mol Genet*. 2008;17: 256–265. doi:10.1093/hmg/ddm302
352. Granados-Riveron JT, Ghosh TK, Pope M, Bu'Lock F, Thornborough C, Eason J, et al. Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Hum Mol Genet*. 2010;19: 4007–4016. doi:10.1093/hmg/ddq315
353. Budde BS, Binner P, Waldmüller S, Höhne W, Blankenfeldt W, Hassfeld S, et al. Noncompaction of the ventricular myocardium is associated with a de novo mutation in the beta-myosin heavy chain gene. *PLoS One*. 2007;2: e1362. doi:10.1371/journal.pone.0001362
354. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138: e653–e711. doi:10.1161/CIR.0000000000000606
355. Granados-Riveron JT, Brook JD. The impact of mechanical forces in heart morphogenesis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5: 132–142. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.961086
356. Granados-Riveron JT, Brook JD. Formation, contraction, and mechanotransduction of myofibrils in cardiac development: clues from genetics. *Biochem Res Int*. 2012;2012: 504906. doi:10.1155/2012/504906

357. Mandalenakis Z, Giang KW, Eriksson P, Liden H, Synnergren M, Wåhlander H, et al. Survival in Children With Congenital Heart Disease: Have We Reached a Peak at 97%? *J Am Heart Assoc.* 2020;9: e017704. doi:10.1161/JAHA.120.017704
358. McElhinney D, Clark B, Weinberg P, et al. Association of chromosome 22q11 deletion with isolated anomalies of aortic arch laterality and branching. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Jun, 37 (8) 2114–2119. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01286-4](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01286-4)
359. Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res.* 2015 Apr 1;105(4):397-408. doi: 10.1093/cvr/cvv025. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25634555; PMCID: PMC4349164.

ANEXO I

CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

CONSENTIMIENTO PARA ESTUDIO GENÉTICO (GRUPO A)

Lugar y Fecha

Información sobre el proyecto de investigación

Las cardiopatías congénitas (CC) constituyen las anomalías congénitas graves más frecuentes y una de las principales causas de mortalidad perinatal. En nuestro país nacen aproximadamente 700.000 niños por año y de ellos 6100 presentan cardiopatías congénitas. Muchos de los casos se deben a cambios en el material genético como por ejemplo anomalías cromosómicas o variaciones en el ADN. Este proyecto propone en primer instancia poder dar respuesta a la causas genéticas más frecuente de las CC conotruncuales, además de investigar otras posibles anomalías genéticas en aquellos pacientes que no las posean. Esta información contribuirá a una mejor comprensión de la enfermedad y posiblemente permitirá un mejor asesoramiento genético familiar.

Consentimiento

Por la presente dejo expreso consentimiento para la utilización de mi sangre y/o la de mi hijo/a para la investigación de posibles anomalías genéticas asociadas a las cardiopatías congénitas. La misma **no** se podrá utilizar para el estudio de otras patologías sin mi expresa autorización por escrito.

Declaro que se me informó que los datos obtenidos con mi contribución permitirían estudiar algunos de los factores implicados en el origen de estas patologías.

Se me informó sobre los procedimientos que se van a seguir y que el presente estudio es con fines de investigación, pero que se podrían generar resultados de valor diagnóstico, de los que seré debidamente informado/a en una entrevista de asesoramiento genético. Asimismo, se me informó que la confidencialidad de mi identidad se preservará durante todo el estudio, en todas las publicaciones que surgieran y que la muestra se destruirá una vez concluido el mismo.

Comprendo que mi participación es enteramente voluntaria y que puedo denegar mi colaboración en cualquier momento si así lo considerare.

Consiento en participar de este proyecto

Tipo y N° de documento	Apellido y Nombre	Firma
------------------------	-------------------	-------

Testigo

Tipo y N° de documento	Apellido y Nombre	Firma
------------------------	-------------------	-------

Firma y sello del médico responsable

.....

ASENTIMIENTO PARA ESTUDIO GENÉTICO (GRUPO A)

Lugar y Fecha

Información sobre el trabajo de investigación

Las cardiopatías congénitas son muy frecuentes y pueden ser graves. Muchos de los casos se deben cambios en el material genético, como por ejemplo cambios en los cromosomas o en el ADN.

En este trabajo se quiere conocer las causas genéticas más frecuentes de estas enfermedades. Esta información ayudará a comprenderlas mejor.

Asentimiento

Por medio de esta nota doy mi asentimiento para que utilicen de mi muestra de sangre en la investigación de posibles anomalías genéticas asociadas a las cardiopatías congénitas. Me explicaron que los datos obtenidos con mi participación permitirían estudiar algunos de los factores que están involucrados en el origen de estas enfermedades. Me explicaron que todos los procedimientos que van a seguir en este estudio son para realizar una investigación, pero que se podrían obtener resultados diagnósticos. En ese caso, mis padres y yo seremos informados en una entrevista.

También me explicaron que mi identidad será confidencial durante todo el estudio, en todas las publicaciones que surgieran y que mi muestra se destruirá una vez terminado el mismo.

Sé que mi participación es enteramente voluntaria y que puedo retirar mi colaboración en cualquier momento si así lo decido.

Asiento en participar de este proyecto

Tipo y N° de documento	Apellido y Nombre	Firma
------------------------	-------------------	-------

Testigo

Tipo y N° de documento	Apellido y Nombre	Firma
------------------------	-------------------	-------

Firma y sello del médico responsable

**PROYECTO DEFECTOS GENÓMICOS EN ANOMALÍAS CONGÉNITAS MÚLTIPLES Y
CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS (GRUPO B)
HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES**

¿Qué debe saber usted sobre este estudio de investigación?

- Usted/es y su bebé están siendo invitada/os a participar en un estudio.
- El estudio es explicado por este consentimiento informado.
- Por favor lea con cuidado y pregunte todo lo que no comprenda.

Los investigadores le brindarán una explicación sobre la investigación y responderán a todas las dudas o preguntas que usted realice. Una vez que usted entienda las características del estudio, y si está de acuerdo en participar, se le solicitará que firme este formulario de consentimiento (dos originales). Un original del mismo le será entregado para que lo guarde.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. Si decide no participar, no tendrá consecuencias para Ud. ni su bebé, ya que recibirá igualmente todos los cuidados médicos necesarios. Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento. Asimismo, puede retirar a su bebé del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique de ninguna manera.

¿Por qué se está llevando a cabo esta investigación?

En la actualidad, pese a los avances de la ciencia, hay enfermedades congénitas en las que se desconoce su causa. Mediante este consentimiento, la/lo invitamos a Ud. y a su bebé a participar de una investigación en la que buscaremos factores de riesgo o genes involucrados en la aparición de estos problemas, de esa manera esperamos encontrar algunas causas de las anomalías congénitas.

¿Qué pasará si acepta participar?

Si usted accede a que su hijo participe en este estudio, se le pedirá que firme este formulario de consentimiento.

Durante las visitas le haremos algunas preguntas sobre los antecedentes de enfermedades o problemas de salud familiares, revisaremos a su hijo y le haremos una extracción de 5 ml de sangre. En la muestra de sangre que se obtenga se estudiarán genes que puedan estar relacionados con las anomalías congénitas, a través de técnicas de análisis de ADN que permiten detectar pequeñas anomalías, además de las técnicas convencionales de estudios de los cromosomas.

A partir de la evaluación de los análisis de sangre que le realicen a su bebé, los médicos le informarán si su bebé tiene que ser controlado nuevamente, o si hay que hacerle otros estudios.

Es importante que Ud. sepa que todos los procedimientos que implica el estudio son habituales.

Las muestras y/o datos podrían ser compartidos con otros investigadores identificando las muestras sólo con una codificación y no revelándose nombre, dirección ni fecha de nacimiento. Los datos genéticos y/o clínicos así identificados podrían ser colocados en una red electrónica de investigación.

ANEXO - I

La información de la base de datos estará accesible sólo a investigadores médicos calificados con acceso autorizado a datos individuales. Estos datos compartidos podrían ser utilizados en investigaciones sobre anomalías congénitas y sus complicaciones.

¿Quién promueve la realización de este estudio?

El Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

¿Cuáles son los riesgos de participar en esta investigación?

No existen riesgos derivados de participar en este estudio.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en este estudio?

Es posible que este estudio no implique un beneficio inmediato para usted, ya que no siempre se hallan las causas de la afección. Sin embargo, puede ocurrir que en el transcurso de la investigación se hallen anomalías en el material genético que sí pudieran estar relacionadas con la patología. Si este fuera el caso, Ud. será informado inmediatamente a los efectos de comunicarle el resultado. Es posible que este resultado le permita acceder a un tratamiento adecuado más rápido o bien permita implementar medidas para acompañar y disminuir las consecuencias de estos problemas de salud.

Es posible que su participación en el estudio proporcione información importante ya que, podría ayudar a los médicos a aprender más acerca de las enfermedades genéticas. Asimismo, es posible que esa información ayude a otros pacientes en el futuro.

¿Tendrá algún costo participar en el estudio?

La participación en este estudio de investigación no tendrá ningún costo para usted ni para su cobertura de salud.

¿Qué ocurrirá si usted decide retirar a su hijo del estudio?

Si usted decide retirar a su bebé del estudio, deberá informárselo a su médico para que se destruyan los datos y muestras obtenidas. Esta decisión no cambiará en absoluto la atención médica que usted y su bebé reciban.

¿Cómo se utilizará la información referida a la salud de su hijo?

La información que se recoja sobre la salud de su hijo será confidencial y solo se usará para los fines de este protocolo y no otro. Sus datos de la historia clínica/ respuestas al cuestionario/ o lo que corresponda, serán codificados usando un número de identificación. Nunca se revelará su identidad ni la de su hijo, en cumplimiento de las leyes de protección de datos personales.

Conservación de muestras para investigaciones futuras:

Las muestras obtenidas en esta investigación pueden ser conservadas por un período de 10 años. Si en algún caso quisieran ser utilizadas en investigaciones futuras, requerirá que se le informe y que usted nuevamente dé su consentimiento. Estas muestras serán identificadas numéricamente y no contendrán ninguna identificación personal. Si usted no desea que conservemos las muestras,

ANEXO - I

entonces serán destruidas luego de terminar el presente estudio. Su decisión respecto de la conservación de las muestras no afectará la participación de su hijo en este estudio.

¿Qué hospitales participan de este estudio?

Este estudio se realizará simultáneamente en los siguientes hospitales:

HOSPITAL	PARTIDO
1- Presidente Perón	Avellaneda
2- P. Fiorito	Avellaneda
3- A. Goitía	Avellaneda
4- Evita	Lanús
5- N. López	Lanús
6- L. Gandulfo	Lomas de Zamora
7- Alende	Lomas de Zamora
8- Mi Pueblo	Florencio Varela
9- A. Oñativia	Almirante Brown
10-L. Melendez	Almirante Brown
11-Evita Pueblo	Berazategui
12-I. Iriarte	Quilmes
13-E. Oller	Quilmes
14-A. Eurnekián	Ezeiza
15-Santamarina	Esteban Echeverría
16-R. Sarda	Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Información de contacto

Si en el transcurso de la investigación surgen dudas o preguntas sobre su participación en este estudio, puede contactar al Dr. Pablo Barbero del Centro Nacional de Genética Médica al teléfono: (011) 48090799 o bien con el Dr. Ricardo Gamboa Hospital El Cruce Teléfono: (011) 4210 9000 interno 2794.

Si tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos como participante de la investigación puede contactarse con el Comité de Ética en Investigación Hospital El Cruce, Soledad Giargei- Av. Calchaquí 5401 (B1888AAE), Florencio Varela, Provincia de Buenos Aires, Teléfono: (011) 4210 9000 interno 1540. Horarios de Atención: lunes a viernes de 9 a 13 hs.

ANEXO - I

El presente trabajo de investigación ha sido evaluado por el Comité de Ética en Investigación Hospital El Cruce, Inscripto en el Registro Provincial de Comités de Ética en Investigación, dependiente del Comité de Ética Central en Investigación – Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires con fecha 05/11/2010, bajo el Nº 023/2010, Folio 62, Libro de Actas Nº 1, y el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

CONSENTIMIENTO INFORMADO (GRUPO B)

PROYECTO DEFECTOS GENÓMICOS EN ANOMALÍAS CONGÉNITAS MÚLTIPLES Y CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

Acepto participar voluntariamente en esta investigación. He sido informado/a que el objetivo de este estudio es evaluar los defectos genéticos relacionados con anomalías congénitas múltiples y cardiopatías congénitas aisladas. Me han explicado claramente las características de la investigación, y han respondido todas mis preguntas. He sido informado/a que puedo hacer preguntas o retirar a mi hijo del proyecto en cualquier momento, sin que eso me perjudique ni tenga consecuencias en la atención médica de mi bebé.

Sé que la información que yo brinde durante esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito sin mi consentimiento. Entiendo que me entregarán un original de este formulario de consentimiento, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando la investigación haya finalizado.

Por favor, complete la frase con SI o No de acuerdo a su decisión:

Acepto que mi hijo participe de esta investigación

SI ☐ NO ☐

Acepto que los datos de su historia clínica sean utilizados para publicaciones científicas, siempre que se oculten sus datos personales

SI ☐ NO ☐

Acepto que se almacenen las muestras biológicas de mi hijo

SI ☐ NO ☐

_____ Nombre y Apellido Madre, Padre o Tutor	_____ Firma	_____ DNI	_____ Fecha
_____ Nombre y Apellido Responsable Legal (si los padres son menores de 18 años)	_____ Firma	_____ DNI	_____ Fecha

ANEXO - I

Nombre y Apellido Testigo	Firma	DNI	Fecha
Nombre y Apellido Investigador	Firma	DNI	Fecha

ANEXO II

FICHAS CLINICA

CARDIOPATIAS CONGÉNITAS (grupo A)**Ficha clínica N°:****Institución que deriva al paciente:****Domicilio:****Tel.:****Apellido y Nombre:****Fecha de nacimiento:****Sexo:****DATOS FAMILIARES Y PERSONALES:****Nombre del Padre****Edad paterna al nacimiento:****Consanguinidad****Nombre de la Madre****Edad materna al nacimiento:****Embarazo:****Teratógenos:****Ecografías:****Gestosis:****Parto:****EG:****APGAR:****PN:****Talla:****Per. cefálico:****ARM:****Incubadora:****Alta de Neo:****FEI:****OEA:****Edad al diagnóstico:**

SIGNOS CLÍNICOS

Fecha:

Peso:

Talla:

PC:

Malformaciones asociadas :	Estudios Complementarios:

Descripción de la cardiopatía:

MULTICENTRICO CCM Y CC AISLADAS 2016-2020 (Grupo B)**Ficha clínica N°:****AG O HCL LOCAL:****Institución:****Domicilio:****Tel.:****Apellido y Nombre:****Fecha de nacimiento:****Sexo:****DNI****DATOS FAMILIARES :****Nombre del Padre****Edad paterna :****Nombre de la Madre****DNI DE LA MADRE:****Edad materna:****MAIL:****FACEBOOK:****EMBARAZO:****ECOGRAFIAS -DATOS POSITIVOS:****TERATÓGENOS :****Parto:****EG:****APGAR:****PN:****Talla:****Per. cefálico:**

SIGNOS CLÍNICOS

Fecha:

Peso:

Talla:

PC:

Malformaciones asociadas :	Estudios Complementarios:

DISMORFIAS

NO

SI -faciales:

-corporales:

FOTO

NO

SI

ANTECEDENTES FAMILIARES PATOLÓGICOS

NO

SI

CONSANGUINIDAD

No

SI:

-grado de parentesco:

-patologías:

ANEXO III

SOLUCIONES

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN**EDTA 0.5M (pH=8)**

Agregar 186,1 g de EDTA.2H₂O a 800ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 8 con NaOH.
Llevar a 1 litro con H₂O destilada. Autoclavar.

SDS 10%

Disolver 100 g de SDS en 900 ml de H₂O destilada. Calentar a 68°C para facilitar la disolución. Ajustar pH a 7,2 agregando gotas de HCl concentrado. Llevar a 1 litro con H₂O destilada. Usar máscara para pesar y limpiar correctamente el área de pesado. No es necesario autoclavar.

TRIS 1M

Disolver 121,1 g de Tris base en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH al valor deseado agregando gotas de HCl concentrado. El pH del Tris es temperatura dependiente, decrece 0,03 unidades de pH por cada gramo de incremento en la T°. Permitir que la solución tome T° ambiente antes del ajuste final de pH. Llevar a 1 litro con H₂O destilada. Autoclavar.

PROTEINASA K

Preparar el volumen deseado de solución stock de 20 mg/ml en H₂O. Alicuotar en tubos eppendorf de acuerdo a los volúmenes calculados para uso y conservar las alícuotas en freezer a -20°C. Descongelar antes de utilizar sólo la alícuota necesaria.

RBC 1X

8,02 g NH₄Cl
1,001 g CO₃HK₂
0,03722 g EDTA.
Llevar a 1 litro con H₂O destilada. Autoclavar.

NaCl 5M

Disolver 292,2g de NaCl en 800 ml de H₂O. Llevar a 1 litro con H₂O destilada. Autoclavar.

TEN

1ml NaCl 5M.
0,5 ml Tris 1M.
0,1 ml EDTA 0.5M
Llevar a 50ml con H₂O destilada. Autoclavar

TE pH8

10mM Tris.Cl (pH 7,4)
1mM EDTA (pH 8,0)

WCLB

10mM de Tris-HCl, 10mM EDTA y 50 mM NaCl
coloque 0.5 mL de Tris-HCl 1M, pH 7.6 en una probeta de 50 mL y añada 1 mL de EDTA, pH 8.0. Agregue 0.1461 g de NaCl y afore a 50 mL con agua destilada. Almacene en un tubo cónico de 50 mL.

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE ADN:**TAE 50X**

242 g Tris base.
57,1 ml Acido acético glacial.
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Llevar a 1 litro. Al momento de ser utilizado, se realiza una dilución a modo de quedar 1X.

BUFFER DE SIEMBRA PARA ADN (LOADING BUFFER)

Solución 6X

0,25 % Azul de bromofenol

0,25 % Xylene cyanol

30 % Glicerol

Conservar a 4° C una vez preparada la solución

ANEXO IV

LISTADO DE GENES INCLUIDOS EN LOS ANALISIS DE SM

A2ML1	Alpha-2-Macroglobulin Like 1
AARS2	Alanyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial
ABCA1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1
ABCB1	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
ABCC9	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 9
ABCD3	ATP Binding Cassette Subfamily D Member 3
ABCG1	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1
ABCG5	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5
ABCG8	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 8
ACAD9	Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 9
ACADVL	Acyl-CoA Dehydrogenase Very Long Chain
ACAN	Aggrecan
ACTA1	Actin Alpha 1, Skeletal Muscle
ACTA2	Actin Alpha 2, Smooth Muscle
ACTB	Actin Beta
ACTC1	Actin Alpha Cardiac Muscle 1
ACTN2	Actinin Alpha 2
ACVR1	Activin A Receptor Type 1
ACVR2B	Activin A Receptor Type 2B
ACVRL1	Activin A Receptor Like Type 1
ADAMTS10	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 10
ADAMTS2	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 2
ADAMTS6	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 6

ADAMTSL4	ADAMTS Like 4
ADNP	Activity Dependent Neuroprotector Homeobox
AGK	Acylglycerol Kinase
AGL	Amylo-Alpha-1, 6-Glucosidase, 4-Alpha-Glucanotransferase
AGPAT2	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 2
AKAP9	A-Kinase Anchoring Protein 9
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1
AKT2	AKT Serine/Threonine Kinase 2
ALDH1A2	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2
ALMS1	ALMS1 Centrosome and Basal Body Associated Protein
ALX3	ALX Homeobox 3
AMH	Anti-Mullerian Hormone
AMPD1	Adenosine Monophosphate Deaminase 1
ANGPTL3	Angiopoietin Like 3
ANK2	Ankyrin 2
ANK3	Ankyrin 3
ANKRD1	Ankyrin Repeat Domain 1
ANKRD11	Ankyrin Repeat Domain 11
ANKS6	Ankyrin Repeat and Sterile Alpha Motif Domain Containing 6
ANO5	Anoctamin 5
AP1B1	Adaptor Related Protein Complex 1 Subunit Beta 1
AP2B1	Adaptor Related Protein Complex 2 Subunit Beta 1
APOA1	Apolipoprotein A1

APOA5	Apolipoprotein A5
APOB	Apolipoprotein B
APOC2	Apolipoprotein C2
APOC3	Apolipoprotein C3
APOE	Apolipoprotein E
ARHGAP31	Rho GTPase Activating Protein 31
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ARID1B	AT-Rich Interaction Domain 1B
ARL13B	ADP Ribosylation Factor Like GTPase 13B
ARL6	ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6
ARMC4	Armadillo Repeat Containing 4
ARX	Aristaless Related Homeobox
ASPH	Aspartate Beta-Hydroxylase
ASXL1	ASXL Transcriptional Regulator 1
ATIC	5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase
ATP5F1E	ATP Synthase F1 Subunit Epsilon
ATP7A	ATPase Copper Transporting Alpha
ATPAF2	ATP Synthase Mitochondrial F1 Complex Assembly Factor 2
B3GALT6	Beta-1,3-Galactosyltransferase 6
B3GAT3	Beta-1,3-Glucuronyltransferase 3
B4GALT7	Beta-1,4-Galactosyltransferase 7
BAG3	BCL2 Associated Athanogene 3
BBS1	Bardet-Biedl Syndrome 1

BBS10	Bardet-Biedl Syndrome 10
BBS12	Bardet-Biedl Syndrome 12
BBS2	Bardet-Biedl Syndrome 2
BBS4	Bardet-Biedl Syndrome 4
BBS5	Bardet-Biedl Syndrome 5
BBS7	Bardet-Biedl Syndrome 7
BBS9	Bardet-Biedl Syndrome 9
BCOR	BCL6 Corepressor
BICC1	BicC Family RNA Binding Protein 1
BLK	BLK Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase
BMP10	Bone Morphogenetic Protein 10
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMPER	BMP Binding Endothelial Regulator
BMPR1A	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A
BMPR1B	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
BSCL2	BSCL2 Lipid Droplet Biogenesis Associated, Seipin
C10orf71	Chromosome 10 Open Reading Frame 71
C1orf127	Chromosome 1 Open Reading Frame 127
CACNA1C	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C
CACNA1D	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D

CACNA2D1	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2delta 1
CACNB2	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 2
CALM1	Calmodulin 1
CALM2	Calmodulin 2
CALM3	Calmodulin 3
CALR	Calreticulin
CALR3	Calreticulin 3
CASQ2	Calsequestrin 2
CASZ1	Castor Zinc Finger 1
CAV1	Caveolin 1
CAV3	Caveolin 3
CAVIN1	Caveolae Associated Protein 1
CAVIN4	Caveolae Associated Protein 4
CBL	Cbl Proto-Oncogene
CBS	Cystathionine-Beta-Synthase
CC2D2A	Coiled-Coil and C2 Domain Containing 2A
CCDC103	Coiled-Coil Domain Containing 103
CCDC114	Coiled-Coil Domain Containing 114
CCDC151	Coiled-Coil Domain Containing 151
CCDC39	Coiled-Coil Domain Containing 39
CCDC40	Coiled-Coil Domain Containing 40
CCND2	Cyclin D2
CD96	CD96 Molecule

CDH2	Cadherin 2
CDKN1C	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C
CEL	Carboxyl Ester Lipase
CEP290	Centrosomal Protein 290
CEP41	Centrosomal Protein 41
CEP57	Centrosomal Protein 57
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
CFC1	Cripto, FRL-1, Cryptic Family 1
CH25H	Cholesterol 25-Hydroxylase
CHD4	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4
CHD7	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 7
CHRM2	Cholinergic Receptor Muscarinic 2
CHST14	Carbohydrate Sulfotransferase 14
CHST3	Carbohydrate Sulfotransferase 3
CIDEA	Cell Death Inducing DFFA Like Effector C
CITED1	Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 1
CITED2	Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2
CITED4	Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 4
CNTRL	Centriolin
COA5	Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 5
COA6	Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 6
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain
COL1A2	Collagen Type I Alpha 2 Chain

COL2A1	Collagen Type II Alpha 1 Chain
COL3A1	Collagen Type III Alpha 1 Chain
COL5A1	Collagen Type V Alpha 1 Chain
COL5A2	Collagen Type V Alpha 2 Chain
COL7A1	Collagen Type VII Alpha 1 Chain
COQ2	Coenzyme Q2, Polyprenyltransferase
COX15	Cytochrome C Oxidase Assembly Homolog COX15
COX6B1	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B1
COX7B	Cytochrome C Oxidase Subunit 7B
CPT2	Carnitine Palmitoyltransferase 2
CREBBP	CREB Binding Protein
CRELD1	Cysteine Rich with EGF Like Domains 1
CRKL	CRK Like Proto-Oncogene, Adaptor Protein
CRYAB	Crystallin Alpha B
CSRP3	Cysteine and Glycine Rich Protein 3
CTNNA1	Catenin Alpha 1
CTNNA3	Catenin Alpha 3
CTNNB1	Catenin Beta 1
CTNND2	Catenin Delta 2
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
CYP2D6	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily D Member 6
CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4
CYP3A5	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5

DAW1	Dynein Assembly Factor with WD Repeats 1
DBP	D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor
DCTN5	Dynactin Subunit 5
DDX11	DEAD/H-Box Helicase 11
DES	Desmin
DGCR2	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 2
DHCR7	7-Dehydrocholesterol Reductase
DISP1	Dispatched RND Transporter Family Member 1
DLD	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
DLL1	Delta Like Canonical Notch Ligand 1
DMD	Dystrophin
DNAAF1	Dynein Axonemal Assembly Factor 1
DNAAF2	Dynein Axonemal Assembly Factor 2
DNAAF3	Dynein Axonemal Assembly Factor 3
DNAAF4	Dynein Axonemal Assembly Factor 4
DNAH11	Dynein Axonemal Heavy Chain 11
DNAH5	Dynein Axonemal Heavy Chain 5
DNAI1	Dynein Axonemal Intermediate Chain 1
DNAI2	Dynein Axonemal Intermediate Chain 2
DNAJC19	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C19
DNAL1	Dynein Axonemal Light Chain 1
DNM1L	Dynamin 1 Like
DNM2	Dynamin 2

DOCK6	Dedicator Of Cytokinesis 6
DOLK	Dolichol Kinase
DRC1	Dynein Regulatory Complex Subunit 1
DSC2	Desmocollin 2
DSG2	Desmoglein 2
DSP	Desmoplakin
DTNA	Dystrobrevin Alpha
DTX3	Deltex E3 Ubiquitin Ligase 3
DVL1	Dishevelled Segment Polarity Protein 1
DYNC2H1	Dynein Cytoplasmic 2 Heavy Chain 1
ECE1	Endothelin Converting Enzyme 1
EFEMP2	EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 2
EGLN3	Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3
EHMT1	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1
EIF2AK3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3
EIF2AK4	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4
ELAC2	ElaC Ribonuclease Z 2
ELN	Elastin
EMD	Emerin
ENG	Endoglin
EOGT	EGF Domain Specific O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase
EP300	E1A Binding Protein P300
ERG	ETS Transcription Factor ERG

ESCO2	Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2
EVC	EvC Ciliary Complex Subunit 1
EVC2	EvC Ciliary Complex Subunit 2
EYA1	EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 1
EYA4	EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 4
FAH	Fumarylacetoacetate Hydrolase
FBN1	Fibrillin 1
FBN2	Fibrillin 2
FBXO32	F-Box Protein 32
FGF12	Fibroblast Growth Factor 12
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FGF6	Fibroblast Growth Factor 6
FGF7	Fibroblast Growth Factor 7
FGF8	Fibroblast Growth Factor 8
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FHL1	Four and A Half LIM Domains 1
FHL2	Four and A Half LIM Domains 2
FHOD3	Formin Homology 2 Domain Containing 3
FIG4	FIG4 Phosphoinositide 5-Phosphatase
FKBP14	FKBP Prolyl Isomerase 14
FKBP1A	FKBP Prolyl Isomerase 1A
FKRP	Fukutin Related Protein
FKTN	Fukutin

FLNA	Filamin A
FLNC	Filamin C
FLT4	Fms Related Tyrosine Kinase 4
FOXC1	Forkhead Box C1
FOXC2	Forkhead Box C2
FOXF1	Forkhead Box F1
FOXH1	Forkhead Box H1
FOXJ1	Forkhead Box J1
FOXL1	Forkhead Box L1
FOXM1	Forkhead Box M1
FOXP1	Forkhead Box P1
FOXP3	Forkhead Box P3
FOXRED1	FAD Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1
FREM2	FRAS1 Related Extracellular Matrix 2
FRYL	FRY Like Transcription Coactivator
FTO	FTO Alpha-Ketoglutarate Dependent Dioxygenase
FUZ	Fuzzy Planar Cell Polarity Protein
FXN	Frataxin
GAA	Glucosidase Alpha, Acid
GATA4	GATA Binding Protein 4
GATA5	GATA Binding Protein 5
GATA6	GATA Binding Protein 6
GATAD1	GATA Zinc Finger Domain Containing 1

GCK	Glucokinase
GDF1	Growth Differentiation Factor 1
GDF2	Growth Differentiation Factor 2
GFM1	G Elongation Factor Mitochondrial 1
GJA1	Gap Junction Protein Alpha 1
GJA5	Gap Junction Protein Alpha 5
GLA	Galactosidase Alpha
GLB1	Galactosidase Beta 1
GLI3	GLI Family Zinc Finger 3
GLIS3	GLIS Family Zinc Finger 3
GNPTAB	N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Subunits Alpha and Beta
GPC3	Glypican 3
GPC6	Glypican 6
GPD1	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1
GPD1L	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol Anchored High Density Lipoprotein Binding Protein 1
GREM2	Gremlin 2, DAN Family BMP Antagonist
GRK3	G Protein-Coupled Receptor Kinase 3
GSK3B	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
GUSB	Glucuronidase Beta
HAND1	Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 1
HAND2	Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2
HCCS	Holocytochrome C Synthase

HCN4	Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 4
HECTD1	HECT Domain E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
HFE	Homeostatic Iron Regulator
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
HNF1A	HNF1 Homeobox A
HNF1B	HNF1 Homeobox B
HNF4A	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha
HOXA1	Homeobox A1
HOXB2	Homeobox B2
HOXB3	Homeobox B3
HOXD13	Homeobox D13
HRAS	HRas Proto-Oncogene, GTPase
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase (NADP (+)) 2, Mitochondrial
IER3IP1	Immediate Early Response 3 Interacting Protein 1
IFT122	Intraflagellar Transport 122
IFT140	Intraflagellar Transport 140
IFT74	Intraflagellar Transport 74
IFT80	Intraflagellar Transport 80
ILK	Integrin Linked Kinase
INS	Insulin
INSIG2	Insulin Induced Gene 2
INSR	Insulin Receptor
INVS	Inversin

IRX3	Iroquois Homeobox 3
IRX4	Iroquois Homeobox 4
IRX5	Iroquois Homeobox 5
ISL1	ISL LIM Homeobox 1
ISM2	Isthmin 2
JAG1	Jagged Canonical Notch Ligand 1
JAM3	Junctional Adhesion Molecule 3
JARID2	Jumonji and AT-Rich Interaction Domain Containing 2
JPH2	Junctophilin 2
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
JUP	Junction Plakoglobin
KANSL1	KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1
KAT6B	Lysine Acetyltransferase 6B
KCNA5	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 5
KCND2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 2
KCND3	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3
KCNE1	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 1
KCNE2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 2
KCNE3	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 3
KCNE5	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 5
KCNH2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2
KCNJ11	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 11
KCNJ2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2

KCNJ5	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 5
KCNJ8	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 8
KCNK17	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 17
KCNK3	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3
KCNQ1	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1
KIF7	Kinesin Family Member 7
KLF10	Kruppel Like Factor 10
KLF11	Kruppel Like Factor 11
KMT2A	Lysine Methyltransferase 2A
KMT2D	Lysine Methyltransferase 2D
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
LAMA2	Laminin Subunit Alpha 2
LAMA4	Laminin Subunit Alpha 4
LAMB3	Laminin Subunit Beta 3
LAMP2	Lysosomal Associated Membrane Protein 2
LBR	Lamin B Receptor
LCAT	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
LDB3	LIM Domain Binding 3
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LDLRAP1	Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1
LEFTY1	Left-Right Determination Factor 1
LEFTY2	Left-Right Determination Factor 2
LEP	Leptin

LIAS	Lipoic Acid Synthetase	MEGF8	Multiple EGF Like Domains 8	MYH7	Myosin Heavy Chain 7
LIPA	Lipase A, Lysosomal Acid Type	MESP1	Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1	MYL2	Myosin Light Chain 2
LIPC	Lipase C, Hepatic Type	MESP2	Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 2	MYL3	Myosin Light Chain 3
LMF1	Lipase Maturation Factor 1	MFAP5	Microfibril Associated Protein 5	MYLIP	Myosin Regulatory Light Chain Interacting Protein
LMNA	Lamin A/C	MGP	Matrix Gla Protein	MYLK	Myosin Light Chain Kinase
LMOD2	Leiomodin 2	MIB1	Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 1	MYLK2	Myosin Light Chain Kinase 2
LOX	Lysyl Oxidase	MID1	Midline 1	MYOCD	Myocardin
LPA	Lipoprotein(A)	MKKS	McKusick-Kaufman Syndrome	MYOM1	Myomesin 1
LPL	Lipoprotein Lipase	MKS1	MKS Transition Zone Complex Subunit 1	MYOM2	Myomesin 2
LRP1	LDL Receptor Related Protein 1	MLYCD	Malonyl-CoA Decarboxylase	MYOT	Myotilin
LRP2	LDL Receptor Related Protein 2	MMP21	Matrix Metalloproteinase 21	MYOZ2	Myozenin 2
LRP6	LDL Receptor Related Protein 6	MRPL3	Mitochondrial Ribosomal Protein L3	MYPN	Myopalladin
LTBP1	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1	MRPL44	Mitochondrial Ribosomal Protein L44	NAT8	N-Acetyltransferase 8 (Putative)
LTBP4	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4	MRPS22	Mitochondrial Ribosomal Protein S22	NDST1	N-Deacetylase And N-Sulfotransferase 1
LZTR1	Leucine Zipper Like Transcription Regulator 1	MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase	NEBL	Nebulette
MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	MTO1	Mitochondrial TRNA Translation Optimization 1	NEK1	NIMA Related Kinase 1
MAP2K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2	MTTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein	NEK8	NIMA Related Kinase 8
MAP3K8	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8	MYBL2	MYB Proto-Oncogene Like 2	NEUROD1	Neuronal Differentiation 1
MCTP2	Multiple C2 And Transmembrane Domain Containing 2	MYBPC3	Myosin Binding Protein C, Cardiac	NEUROG3	Neurogenin 3
MED12	Mediator Complex Subunit 12	MYCN	MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor	NEXN	Nexilin F-Actin Binding Protein
MED13L	Mediator Complex Subunit 13L	MYH10	Myosin Heavy Chain 10	NF1	Neurofibromin 1
MEF2A	Myocyte Enhancer Factor 2A	MYH11	Myosin Heavy Chain 11	NFATC1	Nuclear Factor Of Activated T Cells 1
MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C	MYH6	Myosin Heavy Chain 6	NIPBL	NIPBL Cohesin Loading Factor

NKX2-5	NK2 Homeobox 5	OBSCN	Obscurin, Cytoskeletal Calmodulin and Titin-Interacting RhoGEF	PKD2	Polycystin 2, Transient Receptor Potential Cation Channel
NKX2-6	NK2 Homeobox 6	OFD1	OFD1 Centriole and Centriolar Satellite Protein	PKP2	Plakophilin 2
NME8	NME/NM23 Family Member 8	OPA3	Outer Mitochondrial Membrane Lipid Metabolism Regulator OPA3	PKP4	Plakophilin 4
NNT	Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase	PAX3	Paired Box 3	PLIN1	Perilipin 1
NODAL	Nodal Growth Differentiation Factor	PAX4	Paired Box 4	PLN	Phospholamban
NONO	Non-POU Domain Containing Octamer Binding	PCDH15	Protocadherin Related 15	PLOD1	Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1
NOS1AP	Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein	PCSK5	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 5	PLTP	Phospholipid Transfer Protein
NOTCH1	Notch Receptor 1	PCSK6	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 6	PLXND1	Plexin D1
NOTCH2	Notch Receptor 2	PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9	PMM2	Phosphomannomutase 2
NOTCH3	Notch Receptor 3	PDE2A	Phosphodiesterase 2A	PNPLA2	Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2
NPC1L1	NPC1 Like Intracellular Cholesterol Transporter 1	PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha	POR	Cytochrome P450 Oxidoreductase
NPHP3	Nephrocystin 3	PDHA1	Pyruvate Dehydrogenase E1 Alpha 1 Subunit	PPARA	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha
NPHP4	Nephrocystin 4	PDK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
NPPA	Natriuretic Peptide A	PDLIM3	PDZ And LIM Domain 3	PPP1CB	Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Beta
NR0B2	Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 2	PDX1	Pancreatic And Duodenal Homeobox 1	PPP1R13L	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 13 Like
NR1H2	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 2	PERP	P53 Apoptosis Effector Related to PMP22	PQBP1	Polyglutamine Binding Protein 1
NR2F2	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2	PEX1	Peroxisomal Biogenesis Factor 1	PRDM1	PR/SET Domain 1
NRAP	Nebulin Related Anchoring Protein	PEX13	Peroxisomal Biogenesis Factor 13	PRDM16	PR/SET Domain 16
NRAS	NRAS Proto-Oncogene, GTPase	PHGDH	Phosphoglycerate Dehydrogenase	PRICKLE1	Prickle Planar Cell Polarity Protein 1
NRBF2	Nuclear Receptor Binding Factor 2	PHKA1	Phosphorylase Kinase Regulatory Subunit Alpha 1	PRKAG2	Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 2
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1	PITX2	Paired Like Homeodomain 2	PRKG1	Protein Kinase CGMP-Dependent 1
NSDHL	NAD(P) Dependent Steroid Dehydrogenase-Like	PKD1	Polycystin 1, Transient Receptor Potential Channel Interacting	PSEN1	Presenilin 1
NTF3	Neurotrophin 3	PKD1L1	Polycystin 1 Like 1, Transient Receptor Potential Channel Interacting	PSEN2	Presenilin 2

PSKH1	Protein Serine Kinase H1
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTF1A	Pancreas Associated Transcription Factor 1a
PTK7	Protein Tyrosine Kinase 7 (Inactive)
PTPN11	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11
PYGM	Glycogen Phosphorylase, Muscle Associated
RAB23	RAB23, Member RAS Oncogene Family
RAD21	RAD21 Cohesin Complex Component
RAF1	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
RAI1	Retinoic Acid Induced 1
RANGRF	RAN Guanine Nucleotide Release Factor
RARA	Retinoic Acid Receptor Alpha
RARB	Retinoic Acid Receptor Beta
RARG	Retinoic Acid Receptor Gamma
RASA1	RAS P21 Protein Activator 1
RASA2	RAS P21 Protein Activator 2
RBFOX2	RNA Binding Fox-1 Homolog 2
RBM10	RNA Binding Motif Protein 10
RBM20	RNA Binding Motif Protein 20
RBM24	RNA Binding Motif Protein 24
RBM8A	RNA Binding Motif Protein 8A
RFX6	Regulatory Factor X6
RIT1	Ras Like Without CAAX 1

RNU4ATAC	RNA, U4atac Small Nuclear (U12-Dependent Splicing)
ROBO1	Roundabout Guidance Receptor 1
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RPGRIP1L	RPGRIP1 Like
RPL11	Ribosomal Protein L11
RPL35A	Ribosomal Protein L35a
RPL5	Ribosomal Protein L5
RPS10	Ribosomal Protein S10
RPS17	Ribosomal Protein S17
RPS19	Ribosomal Protein S19
RPS24	Ribosomal Protein S24
RPS26	Ribosomal Protein S26
RPS7	Ribosomal Protein S7
RRAS	RAS Related
RSPH4A	Radial Spoke Head Component 4A
RSPH9	Radial Spoke Head 9 Homolog
RXRA	Retinoid X Receptor Alpha
RXRG	Retinoid X Receptor Gamma
RYR1	Ryanodine Receptor 1
RYR2	Ryanodine Receptor 2
SALL1	Spalt Like Transcription Factor 1
SALL4	Spalt Like Transcription Factor 4
SAR1B	Secretion Associated Ras Related GTPase 1B

SCARB1	Scavenger Receptor Class B Member 1
SCN10A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 10
SCN1B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1
SCN2B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 2
SCN3B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 3
SCN4B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 4
SCN5A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5
SCO2	SCO Cytochrome C Oxidase Assembly Protein 2
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A
SEMA3E	Semaphorin 3E
SETBP1	SET Binding Protein 1
SF3B4	Splicing Factor 3b Subunit 4
SGCA	Sarcoglycan Alpha
SGCB	Sarcoglycan Beta
SGCD	Sarcoglycan Delta
SGCG	Sarcoglycan Gamma
SH3PXD2B	SH3 And PX Domains 2B
SHH	Sonic Hedgehog Signaling Molecule
SHOC2	SHOC2 Leucine Rich Repeat Scaffold Protein
SIX6	SIX Homeobox 6
SKI	SKI Proto-Oncogene
SLC22A5	Solute Carrier Family 22 Member 5
SLC22A8	Solute Carrier Family 22 Member 8

SLC25A3	Solute Carrier Family 25 Member 3
SLC25A4	Solute Carrier Family 25 Member 4
SLC25A40	Solute Carrier Family 25 Member 40
SLC2A10	Solute Carrier Family 2 Member 10
SLC2A2	Solute Carrier Family 2 Member 2
SLC39A13	Solute Carrier Family 39 Member 13
SLCO1B1	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1
SLMAP	Sarcolemma Associated Protein
SMAD1	SMAD Family Member 1
SMAD2	SMAD Family Member 2
SMAD3	SMAD Family Member 3
SMAD4	SMAD Family Member 4
SMAD6	SMAD Family Member 6
SMAD9	SMAD Family Member 9
SMARCA4	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 4
SMARCB1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily B, Member 1
SMARCE1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily E, Member 1
SMC3	Structural Maintenance Of Chromosomes 3
SMS	Spermine Synthase
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNTA1	Syntrophin Alpha 1
SNX17	Sorting Nexin 17
SOS1	SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1

SOS2	SOS Ras/Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 2
SOX2	SRY-Box 2
SOX9	SRY-Box 9
SPEG	Striated Muscle Enriched Protein Kinase
SPRED1	Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1
SPRY1	Sprouty RTK Signaling Antagonist 1
SRCAP	Snf2 Related CREBBP Activator Protein
SRF	Serum Response Factor
STAMBP	STAM Binding Protein
STRA6	Stimulated By Retinoic Acid 6
SUFU	SUFU Negative Regulator Of Hedgehog Signaling
SURF1	SURF1 Cytochrome C Oxidase Assembly Factor
SYNE1	Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein 1
SYNE2	Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein 2
SYNGAP1	Synaptic Ras GTPase Activating Protein 1
TAB1	TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1
TAB2	TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 2
TAZ	Tafazzin
TBC1D32	TBC1 Domain Family Member 32
TBC1D4	TBC1 Domain Family Member 4
TBX1	T-Box 1
TBX18	T-Box 18
TBX2	T-Box 2

TBX20	T-Box 20
TBX3	T-Box 3
TBX5	T-Box 5
TCAP	Titin-Cap
TCOF1	Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1
TDGF1	Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1
TECRL	Trans-2,3-Enoyl-CoA Reductase Like
TFAP2B	Transcription Factor AP-2 Beta
TGFB2	Transforming Growth Factor Beta 2
TGFB3	Transforming Growth Factor Beta 3
TGFBR1	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1
TGFBR2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TLL1	Tolloid Like 1
TMEM175	Transmembrane Protein 175
TMEM43	Transmembrane Protein 43
TMEM67	Transmembrane Protein 67
TMEM70	Transmembrane Protein 70
TMOD1	Tropomodulin 1
TNNC1	Troponin C1, Slow Skeletal and Cardiac Type
TNNI3	Troponin I3, Cardiac Type
TNNI3K	TNNI3 Interacting Kinase
TNNT2	Troponin T2, Cardiac Type
TOPBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1

TOR1AIP1	Torsin 1A Interacting Protein 1
TP63	Tumor Protein P63
TPM1	Tropomyosin 1
TRDN	Triadin
TRIB1	Tribbles Pseudokinase 1
TRIM32	Tripartite Motif Containing 32
TRIM54	Tripartite Motif Containing 54
TRIM63	Tripartite Motif Containing 63
TRPM4	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 4
TSC1	TSC Complex Subunit 1
TSC2	TSC Complex Subunit 2
TSFM	Ts Translation Elongation Factor, Mitochondrial
TTC21B	Tetratricopeptide Repeat Domain 21B
TTC8	Tetratricopeptide Repeat Domain 8
TTN	Titin
TTR	Transthyretin
TWIST1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
TXNRD2	Thioredoxin Reductase 2
UBR1	Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 1
UPF3B	UPF3B Regulator of Nonsense Mediated MRNA Decay
VCL	Vinculin
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
WASHC5	WASH Complex Subunit 5

WDPCP	WD Repeat Containing Planar Cell Polarity Effector
WDR19	WD Repeat Domain 19
WDR35	WD Repeat Domain 35
WDR60	WD Repeat Domain 60
WFS1	Wolframin ER Transmembrane Glycoprotein
WT1	WT1 Transcription Factor
XK	X-Linked Kx Blood Group
ZBTB14	Zinc Finger and BTB Domain Containing 14
ZBTB17	Zinc Finger and BTB Domain Containing 17
ZDHHC9	Zinc Finger DHHC-Type Containing 9
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
ZFHX3	Zinc Finger Homeobox 3
ZFPM2	Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2
ZIC3	Zic Family Member 3
ZMPSTE24	Zinc Metalloproteinase STE24

ANEXO V

CRITERIOS DE CLASIFICACION DE VARIANTES SEGÚN ACMG

Resumen de los criterios de clasificación para variantes puntuales según ACMG

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
Population Data	MAF is too high for disorder <i>BA1/BS1</i> OR observation in controls inconsistent with disease penetrance <i>BS2</i>			Absent in population databases <i>PM2</i>	Prevalence in affecteds statistically increased over controls <i>PS4</i>	
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product <i>BP4</i> Missense in gene where only truncating cause disease <i>BP1</i> Silent variant with non predicted splice impact <i>BP7</i>	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product <i>PP3</i>	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before <i>PM5</i> Protein length changing variant <i>PM4</i>	Same amino acid change as an established pathogenic variant <i>PS1</i>	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease <i>PVS1</i>
Functional Data	Well-established functional studies show no deleterious effect <i>BS3</i>		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common <i>PP2</i>	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation <i>PM1</i>	Well-established functional studies show a deleterious effect <i>PS3</i>	
Segregation Data	Non-segregation with disease <i>BS4</i>		Co-segregation with disease in multiple affected family members <i>PP1</i>	Increased segregation data →		
De novo Data				<i>De novo</i> (without paternity & maternity confirmed) <i>PM6</i>	<i>De novo</i> (paternity & maternity confirmed) <i>PS2</i>	
Allelic Data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant <i>BP2</i> Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant <i>BP2</i>		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant <i>PM3</i>		
Other Database		Reputable source w/out shared data = benign <i>BP6</i>	Reputable source = pathogenic <i>PP5</i>			
Other Data		Found in case with an alternate cause <i>BP5</i>	Patient's phenotype or FH highly specific for gene <i>PP4</i>			