



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
IGNACIO CHÁVEZ

Detección de la delección 22q11.2 por MLPA en una muestra de pacientes con cardiopatía congénita y descripción de su fenotipo.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

CARDIOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A

DRA. ANA CAROLINA CRUZ MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO BUENDÍA HERNÁNDEZ



Ciudad de México a 20 de Julio de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE FIRMAS



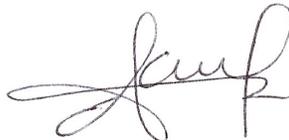
DR. CARLOS RAFAEL SIERRA FERNÁNDEZ
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



DR. ALFONSO BUENDÍA HERNÁNDEZ
Profesor Titular del Curso de Cardiología Pediátrica
Editor en Jefe de la revista Archivos de Cardiología de México
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



DR. JUAN EBERTO CALDERÓN COLMENERO
Jefe del Departamento de Cardiología Pediátrica
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



DRA. ANA CAROLINA CRUZ MIRANDA
Médico Residente de Cardiología Pediátrica
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

INDICE

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Epidemiología.....	1
1.2 Fenotipo.....	2
1.3 Genotipo.....	5
1.4 Genes causantes de malformaciones en SD22q11.2.....	7
1.5 Métodos de detección.....	9
2. ANTECEDENTES.....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
5. JUSTIFICACIÓN.....	13
6. OBJETIVOS.....	15
6.1 Objetivo General	
6.2 Objetivos específicos	
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	17
8. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
9. RESULTADOS.....	20
10. DISCUSIÓN	29
11. CONCLUSIONES.....	31
12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	32
13. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	32
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
15. ANEXOS.....	34

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Instituto Nacional de Cardiología por la oportunidad de pertenecer a la comunidad de residentes así como por las facilidades otorgadas para incursionar en el mundo de la cardiología.

Agradecimiento especial a los pacientes y sus familias que voluntariamente participaron en la realización de este proyecto de investigación.

A todo el Departamento de Biología Molecular, muchas gracias por las facilidades que nos brindaron en el transcurso de estos años, desde la recepción y procesamiento de las muestras hasta la entrega de resultados.

Finalmente, gracias infinitas a mi tutor, el Dr. Alfonso Buendía, quien a pesar de haberse separado este año del departamento y el área clínica, siguió al pendiente de su equipo y me brindó su tiempo, su confianza y sobre todo sus conocimientos y su amor por la genética al permitirme participar en su propio proyecto de vida. Muchas gracias Doctor, por adoptarme como alumna a pesar de las múltiples tareas y obligaciones con las que ya cuenta, le estaré eternamente agradecida.

DEDICATORIAS

Definitivamente le debo todo lo que soy y todo lo que he conseguido a mi familia, no existen personas más importantes para mí que ustedes y es por ello que cada uno de los pasos en mi vida son impulsados por ustedes y dedicados a ustedes.

Gracias papá, por hacerme aprender aún las cosas que pensé que nunca usaría, por insistirme tanto en el inglés y en la investigación como en el orden y el esfuerzo, por siempre hacer crecer mis alas para volar más alto cada vez hasta un día poder alcanzarte, pues siempre has marcado el ejemplo a seguir.

Gracias mamá, por todos los esfuerzos y sacrificios que has hecho sin dudarlo desde el día que me tuviste en tus brazos, por tus palabras de ánimo en los días difíciles y por estar conmigo siempre que te necesité.

Y por último, gracias hermana, sabes que siempre has sido mi guía, mi ejemplo, mi acompañante, mi cómplice y mi mejor amiga; sin tu cuidado y cariño no sería la persona que soy.

RESUMEN

Título. Detección de la delección 22q11.2 por MLPA en una muestra de pacientes con cardiopatía congénita y descripción de su fenotipo.

Objetivo. Identificar la delección 22q11.2 utilizando MLPA en pacientes con cardiopatía congénita y dismorfismo craneofacial sugestivo de síndrome DiGeorge. Describir las características clínicas encontradas y la relación fenotipo-genotipo entre ellas.

Método. Estudio ambispectivo de 182 pacientes captados entre 2012 y 2019 en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Se obtuvo muestra sanguínea de los pacientes con alguna cardiopatía asociada a dismorfismo facial típico y se procesaron mediante MLPA kit P250-B2 (DiGeorge probemix) y/o kit P311-A2 (Congenital Heart Disease) MRC-Holland.

Resultados: Cincuenta y cinco pacientes tuvieron la delección 22q11.2 (30.2%) y 127 no la tuvieron. Entre los 55 pacientes delecionados, el 38% tuvo Tetralogía de Fallot, siendo ésta, la cardiopatía congénita más frecuentemente asociada seguida por Atresia Pulmonar (27%) y Tronco aretrioso común (13%). Se encontró una fuerte relación con arco aórtico derecho en 40% de los casos y subclavia aberrante en 34% de ellos en comparación con el grupo sin delección cromosómica. Los defectos extracardiacos encontrados fueron malformaciones de manos y pies (61%), defectos plaquetarios (40%), alteraciones de la inmunidad (32%), epilepsia (14%), esquizofrenia (9%), hipocalcemia (7%) y malformaciones del tracto genitourinario (7%). Se evaluaron las características del timo en una muestra limitada de pacientes con la microdelección (n=25) encontrando aplasia o hipoplasia en el 24% de ellos. Se procesaron 153 muestras con MLPA P250, 47 (30.7%) resultaron positivas para la delección 22q11.2 y otras 3 resultaron con duplicación de la región crítica del cromosoma 22. De forma aleatoria se procesaron también 107 muestras con MLPA P311, de ellas, 10 (9%) resultaron positivas para la delección y ninguna para otra alteración génica en los locus investigados. Encontramos 3 pacientes con duplicación de la región crítica del cromosoma 22q11.2 que comparten características fenotípicas similares.

Discusión: Al menos el 30% de nuestros pacientes con cardiopatía y dismorfismo facial tienen delección del cromosoma 22q11.2. Al igual que en otras series, la tetralogía de Fallot es la cardiopatía más frecuentemente asociada a este síndrome. Las anomalías de la subclavia y el arco aórtico derecho tienen fuerte asociación con la delección 22q11.2. Las anomalías plaquetarias (trombocitopenia y plaquetas gigantes) son más frecuentes de lo que se ha estudiado y generalmente pasan inadvertidas aunque pueden representar grandes riesgos de sangrado durante las intervenciones cardíacas. El MLPA es una técnica sencilla en comparación con el FISH y que ofrece resultados en menor tiempo con prácticamente el mismo costo o menor y que, además nos permite evaluar delecciones típicas y atípicas definiendo claramente el tamaño y el sitio de la delección pueden ayudar a hacer relaciones entre el genotipo y el fenotipo de cada paciente.

Conclusiones: Aún nos queda por definir qué alteración genética es la causante del espectro clínico del resto de nuestros pacientes, sin embargo; cada vez el estudio molecular nos acerca más a descubrir esta interrogante. La verdadera importancia de estos estudios radica en que al conocer la etiología de las alteraciones del desarrollo podremos realizar la detección de anomalías genéticas de forma oportuna, idealmente en la etapa fetal, establecer una conducta terapéutica a seguir, asesorar a la familia, modificar la historia natural de la enfermedad mejorando la calidad de vida e incluso en algún momento, prevenir la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

La delección 22q11.2 es la microdelección más común en humanos, y es responsable de causar el Síndrome de delección 22q11.2 (SD22q11.2) (término MeSH "Síndrome de DiGeorge"; MIM # 188400, # 192430) que incluye múltiples anomalías congénitas y del desarrollo neurológico con amplia variabilidad fenotípica¹. En 1965 el Dr. Angelo Mari DiGeorge, pediatra norteamericano, describió un grupo de bebés con ausencia congénita del timo y las glándulas paratiroides como parte de la constelación de signos y síntomas de este síndrome, y a partir de ahí ha tomado diversos nombres incluyendo el síndrome de DiGeorge, anomalía conotruncal y síndrome velocardiofacial. Actualmente, en un esfuerzo por ser lo más sistemáticos y precisos posibles, se recomienda utilizar la nomenclatura genética y nombrar como síndrome de delección 22q11.2 a aquellos que cuenten con la microdelección del cromosoma y como síndrome de DiGeorge a los que tienen un fenotipo clásico pero es debido a otra causa genética (generalmente no establecida)².

1.1 Epidemiología

No existe preferencia reportada por grupo étnico ni por sexo, afecta de igual manera a hombres y mujeres. Las estimaciones de la frecuencia de la delección 22q11.2 en la población general varían entre 1/4000 a 1/6000, aunque la mayoría de los estudios reportados están sujetos a sesgos de subvaloración y derivación. Estudios recientes realizados en cohortes prenatales han indicado una mayor incidencia prenatal de $\geq 1/1000$ ³. En 2017, Maisenbacher y colaboradores⁴ en EUA realizaron un estudio en una cohorte de 22,451 de muestras de abortos espontáneos, las cuales fueron analizadas con microarreglos de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) encontrando la delección

22q11.2 en 15 muestras, lo que representa una incidencia global de 1/1497 mayor a la reportada en otra literatura. Doce de esas muestras además se reportaron sin anomalías cromosómicas detectadas por cariotipo y, el 80% de ellas estaban presentes en el cromosoma heredado por vía materna.

Es posible que la incidencia incremente con el paso de los años ya que los adultos afectados con esta entidad cada vez aumentan más su sobrevivencia, los que antes fallecían por defectos cardíacos ahora llegan a la edad adulta y cada vez más de ellos culminan la etapa reproductiva.

El diagnóstico de muchos pacientes se realiza posterior a la detección de cardiopatía congénita (~75%) lo que deja a los individuos menos gravemente afectados sin diagnosticar. En países subdesarrollados y en vías de desarrollo como México, el diagnóstico es aún más complicado pues no todos los centros cuentan con laboratorios de biología molecular, y la realización de un estudio especializado es costoso.

1.2 Fenotipo

El síndrome de delección 22q11.2 puede incluir dismorfismo facial, anomalías del paladar, defectos cardíacos congénitos, hipoparatiroidismo hipocalcémico, deficiencia inmunitaria, discapacidad intelectual y anomalías psiquiátricas entre muchas otras (Tabla 1).

Los hallazgos faciales típicos consisten en una cara verticalmente larga, fisuras palpebrales estrechas y oblicuas hacia abajo, raíz nasal ancha con punta bulbosa, región malar aplanada (hipoplasia medio-facial), retrognatía, implantación baja de pabellones auriculares y hélix sobreplegado (Figura 1). Sin embargo; el fenotipo es variable y las diferentes etnias pueden dificultar el diagnóstico. La mayoría de los estudios que existen hasta ahora se basan en individuos de ascendencia europea siendo escasos los realizados

en latinoamericanos. En 2017 Kruszka y colaboradores ⁵ publicaron un estudio en el que utilizaron tecnología de análisis facial para caracterizar los rasgos típicos de este síndrome; incluyeron 127 fotografías de pacientes con diagnóstico confirmado de delección 22q11.2 pertenecientes a 11 países diferentes que agruparon por etnias (caucásicos, africanos, asiáticos y latinoamericanos), y reportaron como rasgos típicos en latinoamericanos las anomalías nasales, fisuras palpebrales estrechas y párpados encapuchados; y, como hallazgos comunes en todas las etnias, la cardiopatía congénita y los problemas de aprendizaje.



Figura 1. Fotografías de pacientes del INCICH con delección 22q11.2 donde se observa facies típica con fisuras palpebrales estrechas, raíz nasal ancha y punta bulbosa, implantación baja de pabellones auriculares, hélix acopado y retrognatia.

Otros hallazgos típicos de este síndrome son las alteraciones del timo, aplasia o hipoplasia, lo que conlleva a alteraciones de la inmunidad por deficiencia de linfocitos T e infecciones recurrentes que se han reportado hasta en el 75% de los casos. Así mismo, se acompañan de aplasia o hipoplasia de glándulas paratiroides y alteración del metabolismo del calcio, lo que conduce a hipocalcemia. Se ha reportado que la hipocalcemia puede presentarse en cualquier etapa de la vida de estos pacientes y que generalmente suele ser transitoria y asociada a eventos de estrés como infecciones o posterior cirugía cardíaca ^{6, 7}.

Dentro de las cardiopatías congénitas, las troncoconales son las más asociadas al síndrome de delección 22q11.2 (Tetralogía de Fallot, Interrupción del arco aórtico tipo B, tronco arterioso común) pero también defectos septales ventriculares y atriales e incluso defectos del tabique atrioventricular. En el metaanálisis realizado por Rozas et al. ¹ se reporta una cohorte de 217 pacientes chilenos con delección 22q11.2 en la que el 57.6% presentaron defectos cardiacos siendo los más frecuentes la Tetralogía de Fallot con 14.7%, defectos septales ventriculares en 14.7%, Atresia pulmonar en 5.5% e Interrupción del arco aórtico en 5.1% lo que coincide con otro estudio realizado en pacientes mexicanos por Márquez-Avila y colaboradores ⁸.

Tabla1. Características clínicas más frecuentes en pacientes latinoamericanos con Síndrome de Delección 22q11.2 (www.genome.gov/atlas)			
Sistema Nervioso	Hipotonía Problemas de aprendizaje	Cardiacas	Cardiopatía congénita 75% especialmente conotruncales
Craneofacial	Hipertelorismo Raíz nasal ancha Punta de la nariz bulbosa	Sistema Inmune	Hipoplasia del timo Disminución de la producción de células T
Paladar	Insuficiencia velofaríngea Fisura palatina Voz nasal	Endocrino	Hipoparatiroidismo con hipocalcemia
Ojos	Párpado superior cubierto Embriotoxón posterior	Manos y pies	Polidactilia pre y post axial. Pie equinovaro
Oídos	Implantación baja Hélices acopadas o cuadradas	Renal	Agenesia renal Riñón en herradura
Dientes	Hipoplasia Enfermedad periodontal	Gastrointestinal	Problemas de deglución
Esqueléticas	Anomalías cervicales (fusión C2-C3) o vértebras en mariposa	Psiquiátricas	Espectro autista Esquizofrenia Alteraciones de la conducta

La mayoría de los pacientes con esta microdelección tiene déficit en las capacidades cognitivas y se ha reportado que hasta el 25% desarrolla esquizofrenia aunque pueden desarrollar otras anomalías del comportamiento importantes, como el trastorno por déficit de atención y la ansiedad ⁹. Así mismo, existen varios estudios en los que se ha asociado

a este síndrome con enfermedades autoinmunes, citopenias y predisposición a cáncer ¹⁰. En una revisión realizada por Lambert y colaboradores se exponen los principales hallazgos hematológicos en pacientes con deleción 22q11.2 que incluyen aumento del tamaño y disminución del número de las plaquetas con o sin disminución de la función lo que conlleva mayor riesgo de sangrado ¹¹.

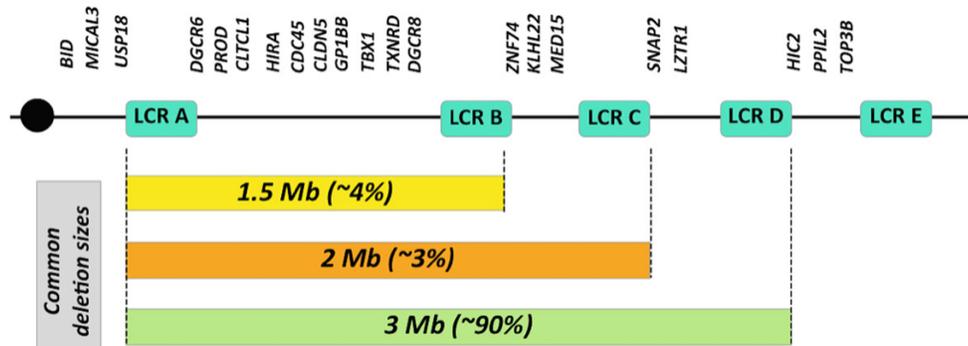
1.3 Genotipo

La gran mayoría de las deleciones 22q11.2 son de novo y son causadas por eventos de recombinación homóloga no alélica meiótica entre repeticiones de copia baja (LCR). Existe reporte de que aproximadamente un 5% se hereda y, cuando esto sucede, existe un riesgo de recurrencia del 50% con penetración del 100% y amplia expresividad ¹². El riesgo de recurrencia para 2 padres con un niño previamente afectado que son genotípicamente normales generalmente se cita como <1%.

Las repeticiones de copia baja (LCR) en el cromosoma 22 se denominan LCR22 y existen 8 que abarcan la región 22q11.2, designadas de la A a la H, todas ellas son susceptibles de reorganizaciones. Las deleciones pueden ser de tamaños variables pero las de 3Mb (LCR-A a D), 2Mb (LCR-A a C) y 1.5Mb (LCR-A a B) son las más comunes (Fig.2). Cada deleción contiene genes diferentes, pero existe una región mínima de superposición, entre las LCR A y B. Por lo tanto, los pacientes con cualquiera de los tres tipos de deleción comunes comparten haploinsuficiencia de los genes entre estas dos LCR proximales ¹². Entre estos genes se encuentra TBX1, que codifica el factor de transcripción T-box 1 considerado el principal contribuyente al fenotipo 22q11.2DS, ya que se ha asociado con cardiopatía congénita y anomalías del paladar. Otros genes como HIRA, UFD1L y CRKL

también se han identificado como genes candidatos involucrados en malformaciones cardíacas.

Fig. 2 Vista esquemática de la región cromosómica 22q11.2. El centrómero se representa por el punto negro. Las cajas verdes ilustran las repeticiones de copia baja (LCR A a E). Se representan las deleciones más



comunes por región y frecuencia. Tomado de *Rozas et al. Orphanet Journal of Rare Diseases (2019)*.

Se ha sugerido que la gravedad de las manifestaciones clínicas podría estar asociada con el tamaño de la deleción, ya que, en deleciones más grandes hay más genes involucrados, sin embargo; en un metaanálisis realizado por Rozas y colaboradores ¹ se concluyó que no existe evidencia de asociación entre el tamaño de la deleción y la presencia de cardiopatía congénita o anomalías del paladar, lo que implica que los genes relevantes para estas manifestaciones están dentro de la región mínima de superposición entre los 3 tamaños de deleción comunes, y sugieren la presencia de modificadores en otras partes del genoma. Este estudio incluyó 8 estudios publicados y una cohorte chilena de 217 casos, logrando un total de 1,523 casos analizados de deleción 22q11.2.

Las variantes fenotípicas extremas observadas en algunos pacientes con SD22q11.2 pueden deberse a mutaciones recesivas en el alelo haploide no deletado. También es posible que mutaciones menos severas o variaciones en el alelo restante puedan contribuir a la variabilidad fenotípica en 22q11.2DS ¹².

Se ha reportado que además de las deleciones atípicas pueden ocurrir duplicaciones casi con la misma frecuencia debido al mismo mecanismo de recombinación homóloga, sin embargo; se han identificado con menos frecuencia ya que por FISH las sondas se superponen visualmente. Usando matrices SNP, las duplicaciones se han encontrado aproximadamente la mitad de las veces que las deleciones, pero el fenotipo resulta ser más leve, caracterizado por retraso en el desarrollo, cardiopatías que incluyen el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, anomalías palatinas, hipocalcemia, convulsiones, microcefalia, estenosis traqueal y pérdida auditiva superponiéndose con las de los pacientes con la deleción ². La existencia de deleciones atípicas subraya la importancia de evaluar el tamaño de la deleción y de comprender la función de los genes en toda la región 22q11.2 para delinear las anormalidades individuales y el fenotipo general del trastorno.

1.4 Genes causantes de malformaciones congénitas en SD22q11.2

Dentro de la región de 3Mb de 22q11.2 hay 45 genes codificadores de proteínas conocidos, 7 miRNA y 10 genes no codificantes así como genes codificadores y no codificadores adicionales. Uno de los más importantes y más estudiados es *TBX1*, que codifica un tipo de factor de transcripción T-box y que juega un papel de suma importancia en diversos procesos embriológicos, se expresa en las células que formarán la región craneofacial, el timo y glándulas paratiroides, el arco aórtico y el tracto de salida cardíaca, que son las estructuras afectadas en el SD22q11.2; las células que expresan *TBX1* se encuentran dentro del aparato faríngeo embrionario, las bolsas faríngeas dan origen a la cara y cuello, las terceras bolsas dan lugar a las glándulas paratiroides y el timo, estas células comunican señales a la cresta neural que originan la migración de sus células hacia el tracto de salida cardíaco y contribuyen a la morfogénesis de las estructuras afectadas

en SD22q11.2^{2, 12}. En estudios realizados en ratones, la inactivación de un alelo resultó en defectos cardiovasculares leves, pero la inactivación de ambos alelos causó paladar hendido, aplasia del timo y paratiroides y defectos cardiovasculares¹³. La haplosuficiencia para *TBX1* conduce a estructuras precursoras más pequeñas debido a la disminución de la proliferación de células endodermales en los arcos branquiales y al desarrollo deficiente de la arteria faríngea. El desarrollo del arco comprometido posteriormente conduce a un desarrollo aberrante de las estructuras faciales, paratiroides y timo. Una cascada de factores de transcripción regula el desarrollo de la paratiroides y el timo, *TBX1* impulsa la expresión de los objetivos posteriores: FGF8, FGF10, MYF5 y MYOD, estos dos últimos regulan el desarrollo de los músculos branquioméricos, quizás explicando las alteraciones de deglución. Otro papel importante de *TBX1* es en el desarrollo del campo cardíaco secundario que da lugar al tracto de salida cardíaca, el ventrículo derecho y el mesénquima cerebral^{12, 14}.

Otro gen involucrado es *CRKL* ubicado en la región LCR22C-D que codifica una proteína adaptadora citoplasmática involucrada en la señalización del factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8); este gen se expresa de manera ubicua en todas las células y actúa en la misma vía genética de *TBX1* participando en el desarrollo del timo y las glándulas paratiroides, el arco aórtico y el corazón además de que contribuye al desarrollo del tracto genitourinario¹⁵. La haplosuficiencia de *GPIIb* se ha asociado fuertemente a la trombocitopenia leve y alteraciones plaquetarias observadas en algunos pacientes¹¹.

En cuanto al estudio de los genes involucrados en el desarrollo neurológico podemos mencionar a *COMT* que codifica la enzima catecol-O-metiltransferasa, que a su vez, participa activamente en el metabolismo de la dopamina; y otro gen estudiado ha sido *PRODH*, que codifica la prolina deshidrogenasa que convierte la prolina en glutamato,

implicada en la neurotransmisión, sin embargo; el papel de la actividad enzimática de estas proteínas para causar déficits cognitivos y / o conductuales aún es controvertida. Otro gen importante es *PIK4CA*, ubicado en la región LCR22C-D que codifica la fosfatidilinositol-4-quinasa alfa y se ha considerado un candidato para la esquizofrenia ^{9, 16}.

Los miRNA son pequeños RNA no codificantes que regulan la expresión de genes diana mediante la unión a sitios específicos en RNA mensajeros que causan la represión de la traducción o degradación. En la región 22q11.2 existen varios genes codificadores de miRNA como DGCR8 (Región Crítica DiGeorge 8) que aún no están del todo estudiados pero que al ser eliminados pudieran ser causantes de las múltiples variantes fenotípicas. deposita la variante de la histona H3.3 en las regiones reguladoras de los genes ¹².

1.5 Métodos de detección

La deleción del cromosoma 22q11.2 se identificó originalmente como una deleción macroscópica visible en un cariotipo, sin embargo; la microdeleción típica es submicroscópica, el estudio de hibridación fluorescente in situ (FISH) utiliza sondas comerciales como N25 o TUPLE específicas marcadas con fluorescencia que identifican el cromosoma y una de ellas que hibrida con la región comúnmente delecionada; si esta segunda sonda está ausente en un cromosoma "marcado", se establece el diagnóstico. Este análisis de FISH requiere mucha mano de obra y la tecnología requiere capacitación y equipos sustanciales por lo que el tiempo de respuesta suele ser de 3 a 14 días, además las sondas se asignan a la región LCR22A-B por lo que son capaces de identificar deleciones típicas (>90%) pero no las atípicas que ocurren fuera de la región A-B ¹⁷. La amplificación múltiple de sonda dependiente de ligación (MLPA) es la técnica de referencia para estudiar las variaciones del número de copias de genes asociadas con la enfermedad,

se puede utilizar para detectar cambios en el número de copias en cualquier cosa, desde cromosomas completos hasta exones individuales y es lo suficientemente sensible como para discriminar las aberraciones en los genes causantes de enfermedades de pseudogenes altamente similares. El MLPA utiliza sondas espaciadas en toda la región 22q11.2 y se puede usar para identificar deleciones típicas y atípicas; la identificación de estas variantes es de particular interés ya que puede proporcionar información sobre qué genes o regiones genómicas son cruciales para las manifestaciones fenotípicas específicas. El análisis MLPA en SD22q11 se realiza principalmente con el kit estándar MLPA P250 DiGeorge (MRC-Holland) que contiene diecinueve sondas para varias regiones, incluidas 4q35, 8p23, 9q34, 10p14, 17p13 y 22q13 como causa del síndrome de DiGeorge o trastornos con características fenotípicas asociadas con estas regiones (Anexo1). Existe también otro kit de MLPA P311-B2 Congenital Heart Disease (MRC-Holland) que contiene 41 sondas MLPA que incluyen 8 sondas para el gen *GATA4*; 4 sondas para el gen *NKX2-5*; 10 sondas para el gen *TBX5*; 4 sondas para el gen *BMP4*; 2 sondas para el gen *CRELD1*; y 3 sondas para la región 22q11.2 (*GP1BB*, *DGCR8* y *CDC45*). Estas sondas detectan alteraciones en los genes más frecuentemente implicados en el desarrollo de cardiopatías congénitas ^{18, 19}.

La prueba de microarreglos de todo el genoma (polimorfismo de un solo nucleótido / microarreglos de genotipado SNP o hibridación genómica comparativa de microarreglos-CGH) es útil cuando no es posible hacer un diagnóstico definitivo basado en la presentación clínica o cuando el MLPA no está disponible.

2. ANTECEDENTES

En el año 2000, Buendía Hernández y colaboradores realizaron los primeros estudios genéticos en 2 pacientes del Instituto Nacional de Cardiología con cardiopatía troncoconal (Tetralogía de Fallot y Atresia pulmonar con CIV) y fenotipo característico demostrando con el método de FISH (TUPLE1) la delección 22q11.2 y estableciendo así la etiología genética de estas cardiopatías²⁰. Este estudio en su momento fue de carácter prospectivo y con el objetivo de continuar con el estudio molecular de los pacientes con estas características. Posteriormente, en el año 2015 Márquez-Ávila y colaboradores publicaron un estudio realizado en el Hospital Infantil de México de 7 años de experiencia (2005-2012) en los que se evaluaron a 62 pacientes con síndrome velocardiofacial con delección 22q11.2 detectada mediante FISH; ellos reportan que la mayoría de los pacientes fueron identificados por cardiólogos pediatras ya que el 97% de ellos presentaron cardiopatía congénita, 77% de tipo troncoconal siendo la tetralogía de Fallot la lesión más común (47%). Encontraron además hipocalcemia por hipoparatiroidismo en 37.5% de los casos; talla baja en 32.5%, paladar anormal en 80% e hipoplasia del timo en 10%, así como algunos grados de problemas psicomotores y de desarrollo en 24 pacientes⁸. Otro de los estudios en población mexicana es el de Ramírez VA y colaboradores, realizado en el IMSS de Guadalajara entre el 2012 y el 2015, en el que se identificaron a 22 pacientes con delección 22q11.2 mediante análisis con FISH (TUPLE1). De ellos, el 86% tuvieron algún defecto cardíaco congénito, principalmente tetralogía de Fallot (52%), 82% tuvieron algún grado de retraso del desarrollo, 23% con anomalías del paladar y 14% alguna inmunodeficiencia²¹.

Todos estos estudios nos han demostrado la frecuente asociación de este síndrome genético con cardiopatías congénitas troncoconales, siendo por ello diagnosticado

principalmente por cardiólogos pediatras, sin embargo, acompañado de muchas otras alteraciones que demandan la atención médica multidisciplinaria. No existen estudios reportados en población mexicana en los que la detección de la microdelección se haya realizado con MLPA, esta técnica nos permitirá no sólo determinar la presencia de la delección sino el análisis del tamaño de la delección y posiblemente el estudio de los genes involucrados en cada aspecto del fenotipo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio y el tratamiento de las cardiopatías congénitas ha tenido un progreso acelerado desde los últimos 50 años, sin embargo; aún no tenemos suficientes conocimientos claros acerca de la etiología de algunas de ellas. Con las técnicas de estudio cromosómico se encontró la delección de la región 11.2 en el brazo largo del cromosoma 22 en pacientes que compartían cardiopatía conotruncal y características fenotípicas típicas. Hoy en día es bien conocida la microdelección del cromosoma 22q11.2 como causa importante de este síndrome, sin embargo; aún no se halla bien definido el mecanismo genético responsable de la amplia variabilidad fenotípica en los portadores de la misma delección. En nuestro Instituto recibimos niños provenientes de toda la república mexicana para el tratamiento de cardiopatías congénitas, un porcentaje importante tiene anomalías troncoconales y muchos de ellos comparten características fenotípicas especiales que, hasta el momento, no se han estudiado desde el punto de vista genético. Con la finalidad de saber cuáles de nuestros pacientes tienen tal delección, y cómo es el comportamiento y las características clínicas de cada uno de ellos se decidió llevar a cabo este trabajo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuántos pacientes atendidos en nuestro Instituto con cardiopatías congénitas asociadas a malformaciones craneo-faciales poseen la delección 22q11.2 y cuáles son sus características clínicas asociadas? ¿Por qué si dos pacientes comparten la misma alteración cromosómica, uno de ellos desarrolla tetralogía de Fallot y el otro sólo un defecto septal? ¿Qué determina que algunos pacientes tengan alteraciones plaquetarias o malformaciones genitourinarias y otros no? ¿El MLPA puede brindarnos información genética suficiente para hacer una correlación genotipo-fenotipo en estos pacientes?

5. JUSTIFICACIÓN

El Síndrome de delección 22q11.2 es uno de los trastornos genéticos más frecuentemente asociado a cardiopatía congénita, sin embargo; es subdiagnosticado, en gran medida porque en nuestro país las técnicas de biología molecular son costosas y no están disponibles en todos los centros, y, en parte porque las características clínicas y la amplia variabilidad fenotípica no son tan reconocidas como lo son por ejemplo las de la trisomía 21, por lo que el índice de sospecha es menor y la amplia variabilidad fenotípica ha dificultado la definición del escenario clínico exacto que justifique la realización de una prueba diagnóstica. La importancia de su reconocimiento y diagnóstico oportuno es importante para el manejo integral de estos pacientes, pues no sólo necesitarán el tratamiento de la cardiopatía sino que necesitarán seguimiento inmunológico, hematológico, neurológico y por varias especialidades médicas, además de que las comorbilidades que presentan incrementan enormemente su mortalidad. Existen pocos estudios realizados en nuestro país que nos brinden un panorama epidemiológico preciso

de esta entidad, anteriormente el diagnóstico se realizaba únicamente con técnicas de hibridación in situ (FISH) que requieren la realización de un cultivo celular y la obtención de cariotipos que son tardados, actualmente existen métodos de biología molecular más precisos y con la ventaja de obtener resultados en menor tiempo como el MLPA. Por otra parte, las familias en riesgo debido a un niño previamente afectado podrían beneficiarse de pruebas parentales para definir el riesgo de recurrencia en futuros embarazos y requerirán del asesoramiento genético para informarles sobre los riesgos de recurrencia y la heterogeneidad fenotípica

De tal manera que el síndrome de delección 22q11.2 representa un problema de salud poco reconocido, que involucra a muchas especialidades médicas pero que generalmente inicia su estudio posterior a la detección de cardiopatía congénita asociada, que además, representa la principal causa de mortalidad; por lo que como cardiólogos pediatras debemos estar 100% familiarizados con el tema para buscar intencionadamente, reconocer y tratar todos los defectos presentes en estos pacientes.

La importancia de estos resultados reside en que al comprobar la etiología genética en algunos de ellos nos permitirá establecer el asesoramiento genético y el tratamiento adecuado a nivel cardiológico así como su seguimiento por las múltiples disciplinas médicas que el paciente requiera de acuerdo a los defectos asociados.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Detectar la deleción 22q11.2 en una muestra de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología y describir los hallazgos clínicos, las características de la cardiopatía congénita y los rasgos epidemiológicos encontrados. Describir si existe alguna correlación entre el genotipo y el fenotipo encontrados.

6.2 Objetivos específicos

1. Brindar un panorama general de la presentación clínica del Síndrome de Deleción 22q11.2 en niños mexicanos a partir de una muestra de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología como centro de referencia nacional que permita estimar la frecuencia real de esta entidad en nuestro país.
2. Discutir la utilidad del MLPA como técnica molecular para el diagnóstico de esta patología en comparación con FISH.
3. Proponer la realización de pruebas diagnósticas a todos los pacientes con cardiopatía congénita y malformación craneofacial que cumplan con las características encontradas para la detección oportuna de 22q11.2SD y el seguimiento médico necesario.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Estudio observacional, descriptivo, transversal y ambispectivo. La inclusión de pacientes se realizó desde el 2012 y hasta diciembre del 2019.

Población de estudio

Se estudiaron a niños (0-18 años) atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología a quienes se les diagnosticó una cardiopatía congénita en presencia de rasgos faciales compatibles con Síndrome de DEL22q11.2. Un total de 237 niños con estas características fueron evaluados inicialmente, sin embargo; se excluyeron del estudio a 55 pacientes debido a que no se obtuvo la información completa de sus expedientes clínicos o no se obtuvo muestra sanguínea suficiente o de buena calidad para realizar el análisis molecular. Se incluyeron entonces a un total de 182 pacientes.

Evaluación clínica

A todos los pacientes incluidos en el estudio (n=182) se les realizó una evaluación cardiológica siguiendo el formato de historia clínica de pacientes con síndrome velocardiofacial (ANEXO 1) que incluyó la historia clínica personal y familiar, examen físico y evaluación de estudios de imagen (ecocardiograma, tomografía de tórax, resonancia magnética y estudios de hemodinamia). Los datos obtenidos del interrogatorio y la evaluación clínica se complementaron con los datos obtenidos del expediente clínico y se concentraron en una hoja de Excel diseñada especialmente para este estudio.

Los rasgos clínicos fueron categorizados por una genetista clínica y evaluados por un pediatra. Se evaluaron también los valores de laboratorio del ingreso de los pacientes para determinar hipocalcemia (Calcio sérico $<8\text{mg/dl}$ o 2mmol/L), trombocitopenia (cuenta plaquetaria $<150,000$) y alteraciones plaquetarias en frotis sanguíneo, así como radiografías de tórax para determinar alteraciones de la columna y reportes de cirugía para determinar alteraciones del timo (hipoplasia o ausencia).

Análisis molecular

A todos los pacientes incluidos en el estudio (n=182) se les tomó muestra sanguínea y se envió al Departamento de Biología Molecular para extracción de DNA genómico y posterior análisis génico por MLPA para determinar la presencia de delección 22q11.2. Se utilizó preferencialmente el kit SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland) para el análisis de las muestras y se escogieron de forma aleatoria algunas muestras para análisis con el kit SALSA MLPA P311-A2 CHD (MRC-Holland) para investigar alteraciones génicas en otros locus comúnmente afectados en pacientes con cardiopatía congénita.

Se escogieron de forma aleatoria a un tercio de los pacientes incluidos en el estudio (n=62) a los cuales se les realizó también la prueba de FISH como método confirmatorio de la delección.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los padres de los pacientes incluidos aceptaron la participación en el estudio y firmaron cartas de consentimiento informado (ANEXO 2). La información clínica de los pacientes así como de sus familiares permanecerá anónima y será utilizada únicamente con fines de investigación. No existen conflictos de interés en este estudio.

9. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva (media, promedio, porcentaje, valores mínimos y máximos) para presentar las variables.

Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Nivel de medición
Sexo	Condición orgánica que identifica a los seres vivos en masculino y femenino	Se expresa como hombre o mujer según lo referido por cada persona	Cualitativa, nominal	Masculino o femenino
Lugar de origen/ Procedencia	Origen de algo o el principio de donde nace o deriva. Nacionalidad de una persona.	Estado de la República donde habitan	Cualitativa, nominal	Estados de la República Mexicana
Diagnóstico de cardiopatía congénita	Alteración en la estructura y el funcionamiento del corazón presente al nacer.	Se evalúa en base al resultado de datos clínicos, ecocardiográficos o de imagen.	Cualitativa, nominal	Tetralogía de Fallot, Tronco arterioso, Interrupción del arco, CIV, etc
Síndrome de Deleción 22q11.2	Conjunto de signos y síntomas causados por la eliminación de un fragmento cromosómico.	Presencia o no de deleción cromosómica determinada por analisis genético (MLPA)	Cualitativa, nominal	CON o SIN deleción
Edad al diagnóstico	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento y el diagnóstico	Años cumplidos al momento del diagnóstico molecular de deleción del cromosoma 22q11.2	Cuantitativa continua	Años
Factores de riesgo maternos	Cualquier rasgo, característica o exposición de la madre que aumente la probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión en el producto.	Se incluyen enfermedad materna previa, genopatía, cardiopatía y exposición a teratógenos,	Cualitativa nominal	CON o SIN factores de riesgo.
Antecedentes familiares	Registro de las relaciones entre los miembros de una familia junto con sus antecedentes médicos.	Presencia de familiares con cardiopatía congénita, malformaciones, epilepsia, retraso mental o síndrome genético.	Cualitativa nominal	CON y SIN antecedente
Malformaciones del timo	Alteraciones anatómicas del timo que ocurren en la etapa intrauterina, debido a factores medioambientales, genéticos, o consumo de sustancias nocivas.	Defecto anatómico del timo visualizado macroscópicamente durante la cirugía cardiaca.	Cualitativa nominal	Ausencia, Hipoplasia o normal
Alteración plaquetaria	Alteraciones en el número, tamaño o función de las plaquetas.	Se evaluaron mediante los reportes de citometría hemática realizados previo a cualquier intervención quirúrgica.	Cualitativa nominal	Trombocitopenia, plaquetas gigantes, normales.
Epilepsia	Enfermedad del sistema nervioso, debida a la aparición de actividad eléctrica anormal en la corteza cerebral produciendo convulsiones.	Determinada en base a estudio neurológico previo, antecedente de convulsiones o instauración de tratamiento anticomicial.	Cualitativa nominal	Presencia o ausencia

Esquizofrenia	Trastorno mental caracterizado por distorsión del pensamiento, percepciones, emociones, conducta y conciencia de sí mismo.	Determinada por evaluación neurológica previa y tratamiento farmacológico con antipsicóticos.	Cualitativa nominal	Presencia o ausencia
Hipocalcemia	Desequilibrio electrolítico definido por un nivel bajo de calcio en la sangre. En niños se toma el valor de acuerdo a su edad.	Evaluada por los niveles de calcio sérico en muestras obtenidas previas a cualquier intervención quirúrgica.	Cualitativa nominal	Hipocalcemia Calcio normal
Malformaciones esqueléticas	Alteraciones óseas que ocurren en la etapa intrauterina, debido a factores medioambientales, genéticos, o consumo de sustancias nocivas.	Se evaluaron las radiografías buscando intencionadamente escoliosis y anomalías vertebrales. Y durante el examen físico: pectum excavatum/carinatum, pie equinovaro, clinodactilia y camptodactilia.	Cualitativa nominal	Presencia o ausencia
Malformaciones del tracto genitourinario	Alteraciones del desarrollo embrionario de las estructuras derivadas de la yema ureteral y conducto mesonefrico de Wolf, ocasionando alteración morfológica y funcional del tracto urinario (riñones, ureteros, vejiga y uretra) y genitales.	Se incluyeron malformaciones como: hernias inguinales, criptorquidia, ectopia renal, aplasia/hipoplasia renal, riñón en herradura, etc.	Cualitativa nominal	Presencia o ausencia
Alteraciones del sistema inmune	Trastornos causados por mecanismos del sistema inmunitario anormales o ausentes, sean humorales, celulares, o ambos	Definimos por historia de infecciones severas recurrentes o cuenta de linfocitos menor a la mínima de acuerdo a la edad.	Cualitativa nominal	Presencia o ausencia

10.RESULTADOS

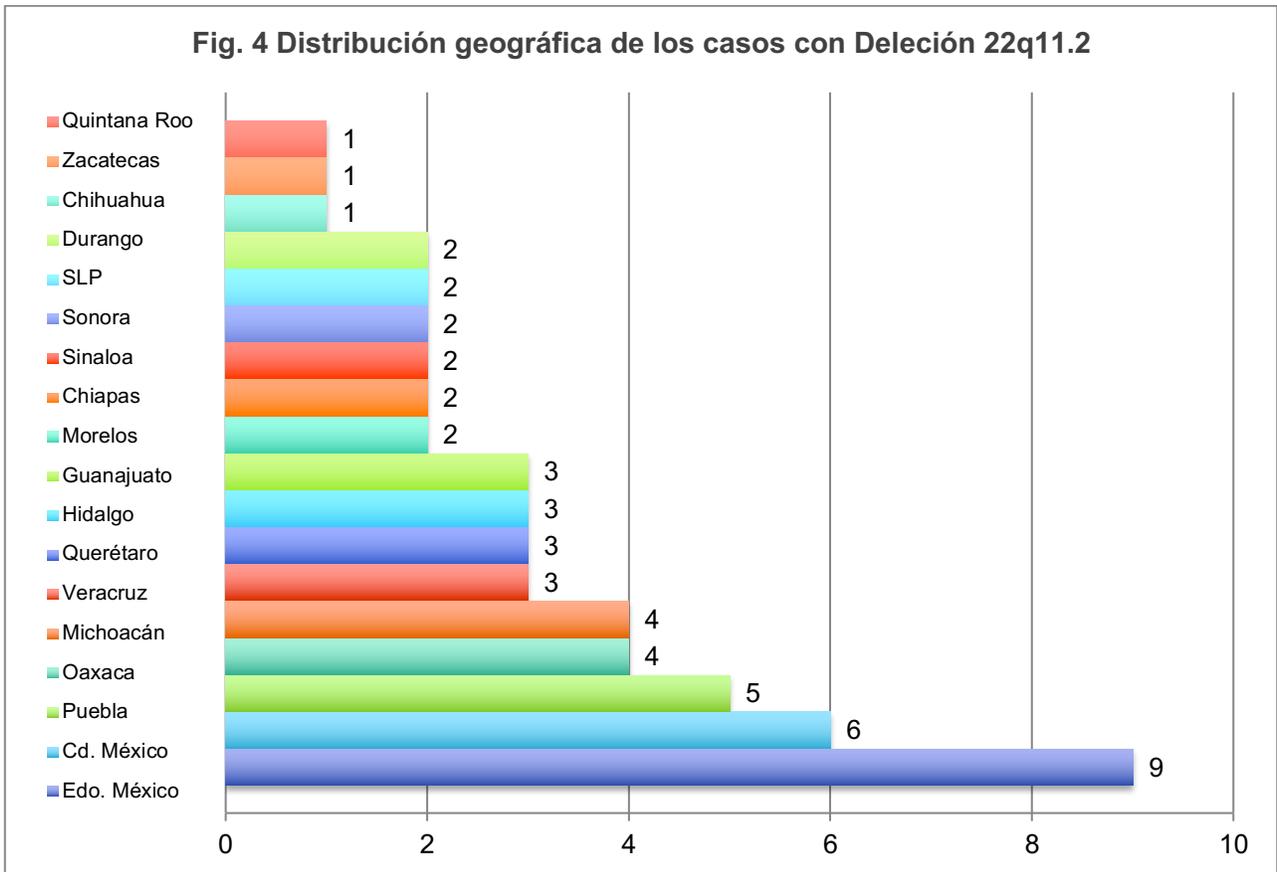
Se identificaron en total a 237 pacientes con cardiopatía congénita y dismorfismo craneofacial sugestivo de SD22q11.2, de los cuales 55 fueron excluidos del estudio ya que no se obtuvo la información completa de los expedientes o la muestra sanguínea fue insuficiente; por lo que presentaremos los resultados observados en 182 pacientes (n=182) 95 masculinos y 87 femeninos. De éstos, cincuenta y cinco resultaron positivos para delección 22q11.2 mediante detección por MLPA representando el 30.2% de la muestra (Fig. 3).



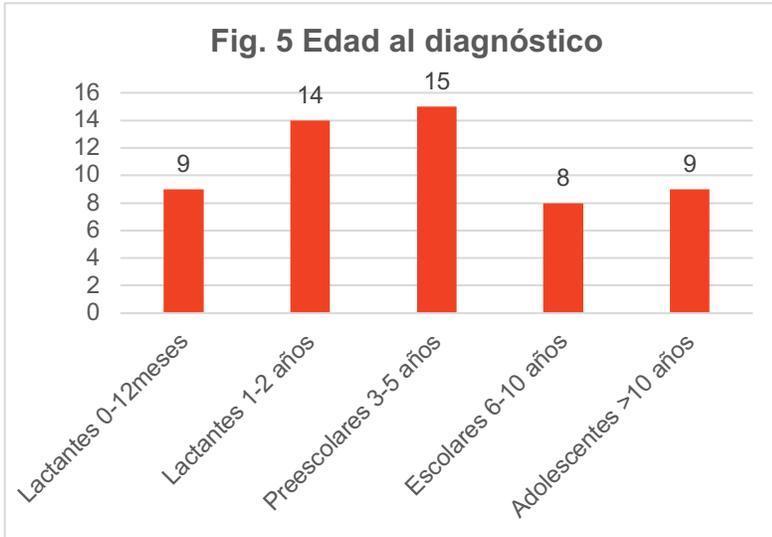
Fig. 3 Distribución de la muestra

Dentro de las características epidemiológicas, 35 de los casos fueron de sexo masculino y 20 femenino con una proporción 1.75:1 a favor del sexo masculino. La mayoría de los casos fueron provenientes del Estado de México y la Ciudad de México, seguidos por Puebla, Oaxaca y Michoacán, observando mayor cantidad de casos provenientes de las grandes ciudades (Fig. 4). En cuanto a la edad a la que se realizó el diagnóstico de la microdelección tomamos en cuenta la fecha en que se ingresaron al estudio y se realizó la

toma de muestra, encontrando un promedio de 4.9 años con una distribución por grupos etarios como se muestra en la Figura 5.

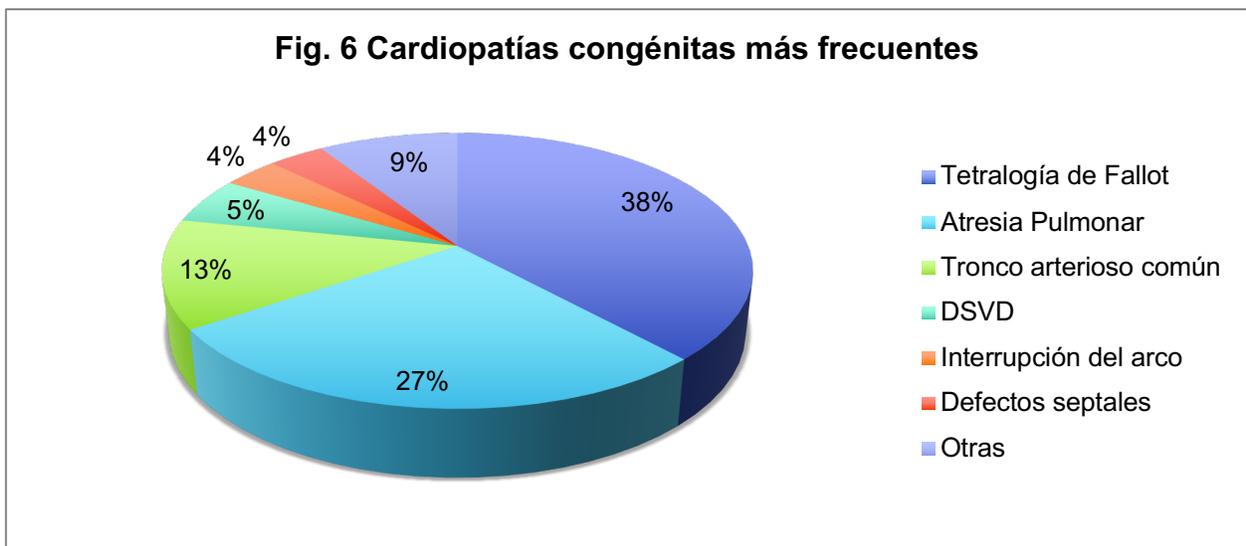


En comparación con el grupo de pacientes sin delección cromosómica, en el grupo de pacientes con SD22q11.2 se encontraron como factores de riesgo prenatales a 4 madres con antecedente de cardiopatía congénita y 3 madres con antecedente de síndrome dismórfico no estudiado. Se investigaron los antecedentes familiares de todos los pacientes con SD22q11. Ningún paciente tuvo antecedentes familiares de consanguinidad, pero en 5 de ellos se reportó endogamia. Ocho pacientes tuvieron antecedentes familiares de cardiopatía congénita, seis de convulsiones/epilepsia, cuatro de esquizofrenia, nueve de alguna otra malformación congénita extracardiaca y sólo dos con algún familiar diagnosticado con SD22q11.2.



La distribución encontrada para la frecuencia de las cardiopatías congénitas se muestra en la Figura 6. La mayoría de los casos corresponden a Tetralogía de Fallot (21 casos) seguidos por Atresia Pulmonar en todas sus variedades (15 casos), de éstos,

catorce asociados a CIV y sólo 1 caso con septum interventricular íntegro. El tronco arterioso común representó la tercera cardiopatía más frecuente con 7 casos, 5 de ellos clasificados como Tipo I de Van Praagh, 1 del Tipo II y 1 del Tipo III. La Doble vía de salida del ventrículo derecho representó el 5.4% con 3 casos, todos ellos con CIV subaórtica y denominación de “tipo Fallot”. Otras cardiopatías menos frecuentes fueron el síndrome de válvula pulmonar ausente, anillo vascular por subclavia derecha aberrante, la subclavia derecha aberrante como cardiopatía aislada, doble cámara ventricular derecha y dextromorfismo, cada una de ellas con 1 caso.



Dentro de la evaluación cardiológica, se determinaron también las alteraciones del arco aórtico, subclavias y retorno venoso sistémico, encontrando los siguientes resultados:

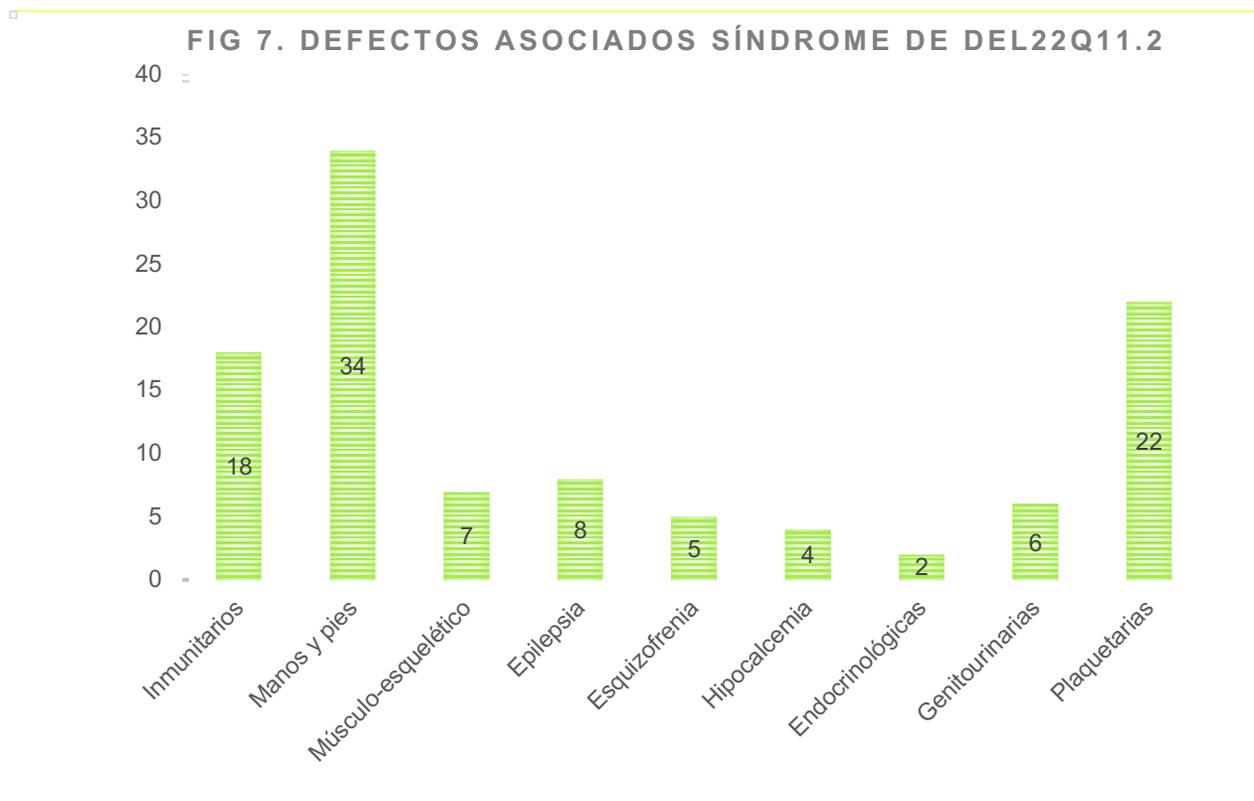
De los casos positivos para delección 22q11.2, veintidós pacientes tuvieron arco aórtico derecho (40%), diecinueve pacientes con origen o trayecto aberrante de las subclavias (34%) y seis pacientes con persistencia de vena cava superior izquierda (10%). En comparación con aquellos pacientes que resultaron negativos para la delección cromosómica, se observa una diferencia significativa en las alteraciones de las subclavias que sólo se presentaron en el 5.5% de los casos (Tabla 2).

Tabla 2. Anomalías extracardiacas asociadas

Anomalías asociadas	DEL22q11.2 (n=55)	Sin delección (n=127)
Arco aórtico derecho	40% (22)	21% (27)
Subclavia aberrante	34% (19)	5.5% (7)
VCS izquierda persistente	10% (6)	12.5% (16)

Los defectos extracardiacos encontrados en los pacientes con SD22q11.2 fueron malformaciones de manos y pies en 34 pacientes (61%) la mayoría de ellos con digitalización del 5º dedo, sólo uno con camptodactilia y uno con pie equino varo. Alteraciones de la inmunidad en 18 pacientes (32%) definidas como disminución de la cuenta de linfocitos o historia de internamientos por infecciones recurrentes. Ocho pacientes (14.5%) contaban con diagnóstico neurológico de epilepsia y 5 (9%) se encontraban bajo tratamiento antipsicótico por esquizofrenia o alteraciones conductuales con personalidad agresiva, solamente uno de los pacientes con epilepsia tenía reporte de hidrocefalia y desmielinización de la cápsula interna por estudio de resonancia magnética, el resto de ellos no contaban con estudio de imagen o se reportaba normal.

Se evaluaron los niveles de calcio sérico en las determinaciones previas a cualquier procedimiento intervencionista o quirúrgico para evitar el factor de estrés y se encontró hipocalcemia sólo en 4 pacientes (7%), uno de ellos con antecedente de hipocalcemia neonatal severa. Encontramos 6 pacientes (11%) con alguna malformación del tracto genitourinario, 2 de ellos con criptorquidia, 2 con hernia inguinal, 1 con reflujo vesicoureteral y 1 con ectopia renal + criptorquidia. Solamente 2 pacientes presentaron alguna alteración endocrinológica, uno con hipotiroidismo y otro con deficiencia de vitamina D, sin embargo, no evaluamos talla baja en nuestro estudio. En cuanto a las malformaciones del sistema musculoesquelético, 4 pacientes con escoliosis, 1 con tórax carinatum, 1 con vértebras en mariposa y 1 con hipotonía, siete en total (12%).



Para la evaluación hematológica, se revisaron todos los estudios de biometría hemática previos a cualquier intervención quirúrgica o intervencionista de cada paciente y se encontraron un total de 22 pacientes portadores de delección 22q11.2 con anomalías plaquetarias, que corresponden al 40% de la muestra; de ellos, 17 portadores de trombocitopenia (77%) y 11 con reporte de plaquetas gigantes (50%). No evaluamos la función plaquetaria ni el riesgo de sangrado.

Se evaluaron las características de una muestra limitada de pacientes que habían sido sometidos a cirugía cardíaca con acceso a través de esternotomía media y en quienes se encontró reporte en la nota quirúrgica de las características del timo. De los 182 pacientes incluidos en el estudio, 74 cubrieron estas características (40%), 25 de los cuales resultaron además positivos para la delección 22q11.2 y de ellos, el 24% tenía reporte de hipoplasia o ausencia del timo en comparación con aquellos pacientes sin delección cromosómica en los que el 10% presentaron estas alteraciones. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características del timo evaluadas durante el transquirúrgico de una muestra de pacientes

	Con Delección 22q11.2	Sin delección	Total
Pacientes evaluados	25	49	74
Aplasia/hipoplasia del timo	6 (24%)	5 (10.2%)	11 (14.8%)
Timo normal	19 (76%)	44 (89.8%)	63 (85.2%)

En cuanto al análisis molecular, se procesaron 153 muestras con MLPA kit p250-B2 (DiGeorge probemix) de las cuales 47 resultaron positivas para la delección (30.7%) encontrando en 8 (17%) de los casos delecciones atípicas y en 39 (83%) la delección típica; además, se encontraron otros 3 pacientes con duplicación de la región crítica del

cromosoma 22. La correlación genotipo-fenotipo de estos pacientes se muestra en la Tabla 4 y el análisis de la dosis génica en la Fig.8 y 9.

Así mismo, se procesaron 107 muestras aleatorizadas con MLPA kit p311-A2 (Congenital Heart Disease) para investigar si podían compartir algún rearrreglo génico en otros locus comúnmente deletados en pacientes con otras cardiopatías congénitas ya que este kit incluye sondas específicas para diferentes genes relacionados a cardiopatía ubicados en los cromosomas 3, 5, 8, 12, 14 y 22 incluyendo a *GATA4*, *NKX2-5* y *TBX5*. De las 107 muestras sólo 10 (~9%) resultaron positivas para la delección típica del cromosoma 22 y en ninguna de ellas se evidenció alteración en otros locus.

Tabla 4. Correlación genotipo-fenotipo de algunos pacientes analizados con MLPA kit P250 -B2 MRC-Holland

Paciente	Alteración molecular	Cardiopatía	Anomalías asociadas	Problemas inmunidad	Alteración plaquetaria	Epilepsia	RDPM
SD-19-79	Duplicación 22q11.2	Tetralogía de Fallot	Arco aórtico derecho	No	No	No	No
SD-19-82	Duplicación 22q11.2	Tetralogía de Fallot	Ninguna	No	No	No	Sí
SD19-83	Duplicación 22q11.2	Dextrocardia, discordancia AV, DSVD, EP	Ninguna	No	No	No	No
SD-18-67	Delección atípica (9 sondas)	Tetralogía de Fallot	Válvula pulmonar ausente	Sí	Sí	No	No
SD-18-72	Delección atípica (9 sondas)	Tronco arterioso común	Doble arco aórtico	No	No	No	No
SD19-97	Delección atípica (9 sondas)	Tronco arterioso común	Arco aórtico derecho	No	No	No	No
SD-16-40	Delección típica (14 sondas)	Tetralogía de Fallot	Arco aórtico derecho	No	No	No	No

SD18-68	Delección típica (14 sondas)	Tronco arterioso común	Subclavia aberrante	Ausencia de timo	No	No	No
SD-19-88	Delección típica (14 sondas)	DSVD tipo Fallot	Ninguna	Sí	No	No	No

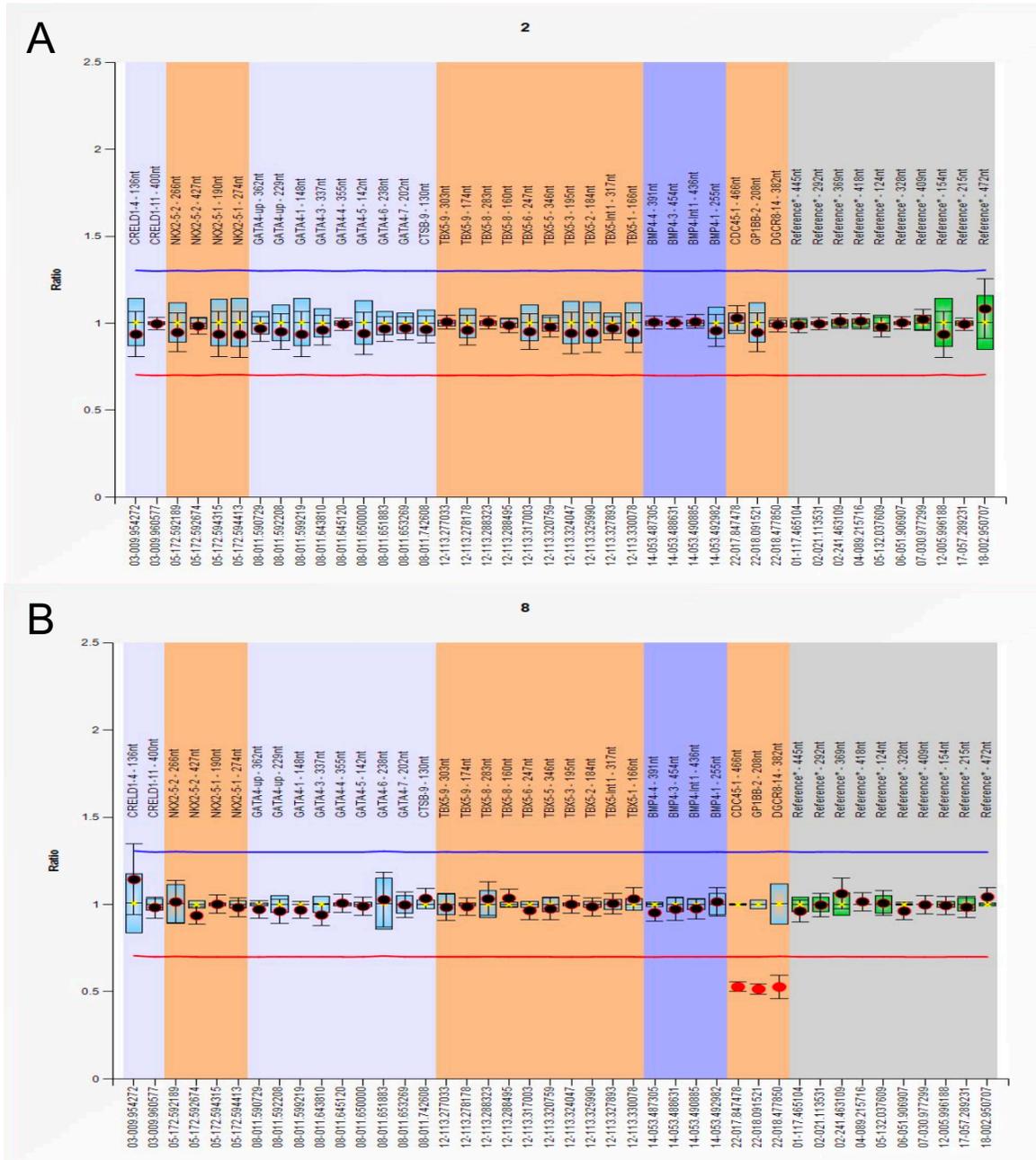


Fig. 8 Análisis de la dosis génica para cardiopatías congénitas en pacientes con sospecha de SD22q11.2. A) Paciente sin delección (2n). B) Paciente con delección del LCR-A (1n para los genes *CDC45L*, *GP1BB* y *DGCR8*). MLPA meclad de sondas P311, MRC-Holland.

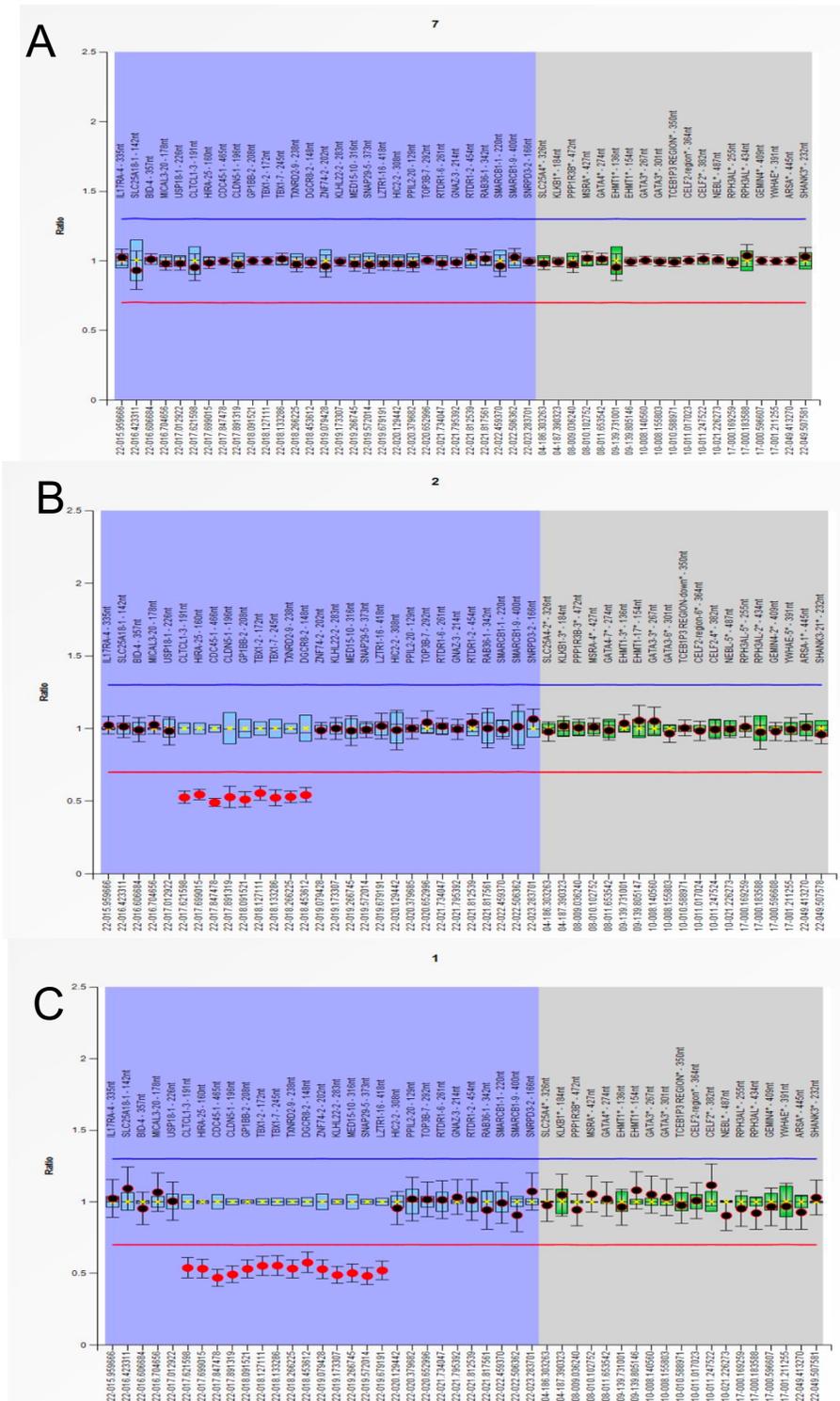


Fig. 9 Dosis génica en diferentes pacientes con sospecha de SD22q11.2. A) Paciente sin delección (2n). B) Paciente con delección completa del LCR-A (1n para los genes *CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*) C) Paciente con delección de LCR-A, B y C (1n para los genes *CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*, *ZNF4*, *KLHL22*, *MED15*, *SNAP29*, *LZTR1*). MLPA mezcla de sondas P250, MRC-Holland.

11. DISCUSIÓN

Una gran proporción de los pacientes con cardiopatía congénita que se atienden en nuestro Instituto poseen alguna alteración genética clínicamente evidente y, aunque se ha asumido que la trisomía 21 es la principal genopatía asociada a cardiopatía congénita (con incidencia 1 de cada 1,000 RNV) , en nuestra experiencia, son menos los pacientes con fenotipo Down que vemos y prevalece así el fenotipo del síndrome DiGeorge.

Al contrario que en otros estudios, nosotros encontramos cierto predominio de afectación en el sexo masculino. La media de edad al diagnóstico correspondió al grupo de los preescolares seguida de lactantes mayores, esto en parte porque las características faciales suelen ser más evidentes a esta edad que en el recién nacido o lactante menor, pero también porque suele ser la edad en la que se manifiesta la clínica de la tetralogía de Fallot en su forma común, que resulta ser la cardiopatía más comúnmente asociada a este síndrome, y, ya que la mayoría de las veces el estudio de estos pacientes comienza tras la detección de la cardiopatía, eso nos explica el pico de detección a esta edad. A pesar de que se investigaron de forma intencionada los factores de riesgo a los que pudo estar expuesta la madre durante el embarazo así como los antecedentes heredofamiliares del paciente no logramos detectar algún determinante claro, pocos de ellos en realidad tenían algún familiar de primer grado con cardiopatía congénita, síndrome dismórfico o enfermedades neurológicas, lo cual apoya el hecho de que la mayoría de los casos ocurren por deleciones de novo. Al igual que los estudios realizados en población mexicana por Ramírez-Velazco y Márquez-Ávila ^{8, 21}, la distribución que encontramos de las cardiopatías congénitas fue la misma, siendo la tetralogía de Fallot la más frecuente, seguida de atresia pulmonar y tronco arterioso común; todas ellas con origen embriológico troncoconal. Un hallazgo a destacar es la fuerte asociación que existe de las cardiopatías congénitas con

defectos del arco aórtico y origen y trayecto anómalos de las aretrias subclavias, que, aunque se ha mencionado con anterioridad en otros estudios, no se había descrito su gran frecuencia, tanto así que podrían usarse como una especie de marcador anatómico que ayude a la sospecha clínica de esta entidad.

A diferencia de otros ensayos, nosotros incluimos el estudio de las alteraciones plaquetarias que fueron de los más frecuentemente asociados junto con las malformaciones de manos y pies y las alteraciones del sistema inmune aunque son mucho menos estudiados a pesar de que pueden representar un mayor riesgo de hemorragia durante las intervenciones cardiacas. Su alteración se explica ya que el gen *GPBB1* implicado en el desarrollo y función plaquetaria se ubica en la región crítica de deleción y se encontró deletado en todos nuestros pacientes. No evaluamos las alteraciones del calcio durante o posterior a la cirugía, sin embargo; existe evidencia en la literatura de que estos pacientes pueden tener alteración de su metabolismo en cualquier etapa de la vida y sobre todo asociado a eventos de estrés por lo que nuestra evaluación no refleja la frecuencia real de esta alteración.

En cuanto al análisis molecular, la técnica de detección por MLPA resulta ser un instrumento sencillo de realizar en comparación con el FISH y que ofrece resultados en menor tiempo con prácticamente el mismo costo o menor y que, además nos permite evaluar no sólo la presencia de deleciones típicas sino también deleciones atípicas y duplicaciones definiendo claramente el tamaño y el sitio de la deleción que nos podrán ayudar a hacer relaciones entre el genotipo y el fenotipo de cada paciente.

Si bien, varios pacientes resultaron positivos para la deleción 22q11.2, muchos otros que también cumplían con las características clínicas del síndrome de DiGeorge resultaron negativos, esto se podría explicar en parte por las interacciones medioambientales del

entorno materno-fetal y la regulación de la expresión genética, y en parte porque pueden existir mutaciones puntuales del gen TBX1 que por sí solas se han reportado como causa del Síndrome DiGeorge tipo 2 y como causa principal de anomalías cardíacas troncoconales y que no pueden detectarse mediante FISH o MLPA sino únicamente por técnicas de secuenciación con mayor poder de resolución (HRM o SSCP) por lo que aún queda bastante terreno por recorrer en el ámbito de la biología molecular.

12. CONCLUSIONES

Pudimos comprobar que al menos el 30% de nuestros pacientes cardiopatas con dismorfismo facial pertenecen al grupo del síndrome de delección 22q11.2, sin embargo, aún nos queda por definir qué alteración genética es la causante del espectro clínico del resto de nuestros pacientes. Lo que es un hecho, es que cada vez el estudio molecular nos acerca más a descubrir esta interrogante, el empleo del MLPA como técnica de diagnóstico nos proporciona mayor información que las técnicas cromosómicas y puede ayudarnos a establecer una relación genotipo-fenotipo. La verdadera importancia de estos estudios radica en que al conocer la etiología de las alteraciones del desarrollo podremos realizar la detección de anomalías genéticas de forma oportuna, idealmente en la etapa fetal, establecer una conducta terapéutica a seguir, asesorar a la familia, modificar la historia natural de la enfermedad mejorando la calidad de vida e incluso en algún momento, prevenir la enfermedad.

Como cardióloga pediatra, mi tarea será difundir en el grupo médico las características más representativas de este síndrome, haciendo especial énfasis en las cardiopatías asociadas pues casi todas serán susceptibles de tratamiento, sin embargo; se deben evaluar el resto de las malformaciones y defectos que suelen incrementar la morbi-mortalidad en estos pacientes y que comúnmente pasan inadvertidos para muchos.

13. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una parte de la información se obtuvo únicamente de los expedientes clínicos de cada paciente, algunos de ellos no contaban con nota quirúrgica completa o estudios de laboratorio por lo que no se pudo completar la información requerida.

Por otra parte, el estudio molecular no ha podido ser completado en la totalidad de los pacientes que se han identificado ya que, como se ha mencionado, el análisis es costoso y por el momento no contamos con patrocinios para la compra de los kits para MLPA.

14. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	2019									2020											
	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Diseño del proyecto	X	X	X																		
Revisión de bibliografía				X	X	X	X					X	X	X							
Toma de muestras	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
Revisión de expedientes									X	X	X	X	X	X							
Elaboración de base de datos											X	X	X	X							
Obtención resultados													X	X	X						
Análisis de datos														X	X						
Escritura de la tesis															X	X					
Entrega de la tesis																X					

15. REFERENCIAS

1. Rozas MF, Benavides F, León L, Repetto GM. Association between phenotype and deletion size in 22q11.2 microdeletion syndrome: systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14:195.
2. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)*. 2011;90:1-18.
3. Grati FR, Molina Gomes D, Ferreira JC, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn*. 2015;35:801-809.
4. Maisenbacher MK, Merrion K, Pettersen B, et al. Incidence of the 22q11.2 deletion in a large cohort of miscarriage samples. *Mol Cytogenet*. 2017;10:6.
5. Kruszka P, Addissie YA, McGinn DE, et al. 22q11.2 deletion syndrome in diverse populations. *Am J Med Genet A*. 2017;173:879-888.
6. Fujii S, Nakanishi T. Clinical manifestations and frequency of hypocalcemia in 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatr Int*. 2015;57:1086-1089.
7. Cabrer M, Serra G, Gogorza MS, Pereg V. Hypocalcemia due to 22q11.2 deletion syndrome diagnosed in adulthood. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*. 2018;2018.
8. Márquez-Ávila CS, Vizcaíno-Alarcón A, García-Delgado C, et al. Velocardiofacial syndrome in Mexican patients: Unusually high prevalence of congenital heart disease. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015;79:1886-1891.
9. Bassett AS, Chow EW. Schizophrenia and 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Psychiatry Rep*. 2008;10:148-157.
10. McDonald-McGinn DM, Reilly A, Wallgren-Pettersson C, et al. Malignancy in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Am J Med Genet A*. 2006;140:906-909.
11. Lambert MP, Arulselvan A, Schott A, et al. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. *Am J Med Genet A*. 2018;176:2121-2127.
12. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176:2070-2081.
13. Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagül I, Campbell CE, Rauch A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet*. 2007;80:510-517.
14. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*. 2003;362:1366-1373.
15. Van Batavia JP, Crowley TB, Burrows E, et al. Anomalies of the genitourinary tract in children with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2019;179:381-385.
16. Philip N, Bassett A. Cognitive, behavioural and psychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Behav Genet*. 2011;41:403-412.
17. Geddes GC, Butterly M, Sajan I. FISH for 22q11.2 deletion not cost-effective for infants with congenital heart disease with microarray. *Pediatr Cardiol*. 2015;36:531-536.
18. Evers LJ, Engelen JJ, Houben LM, Curfs LM, van Amelsvoort TA. The use of two different MLPA kits in 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet*. 2016;59:183-188.
19. Jalali GR, Vorstman JA, Errami A, et al. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat*. 2008;29:433-440.
20. Buendía-Hernández A, Calderón-Colmenero J, Aizpuru E, et al. Delección en el cromosoma 22 (22q.11.2). Etiología de cardiopatías congénitas troncoconales. Vol 70. Instituto Nacional de Cardiología: Arch Inst Cardiol; 2000:148-153.
21. Ramírez-Velazco A, Rivera H, Vásquez-Velázquez AI, Aguayo-Orozco TA, Delgadillo-Pérez S, Domínguez MG. 22q11.2 deletion detected by in situ hybridization in Mexican patient with velocardiofacial syndrome-like features. *Colomb Med (Cali)*. 2018;49:219-222.

16. ANEXOS

Anexo 1. HISTORIA CLÍNICA

HISTORIA CLINICA PACIENTES 22q11

Nombre: Jesús Godínez Lira Edad: _____ Fecha Nac: _____
Registro: H111 Domicilio: _____ Teléfono: _____
Fecha: 4 Ago 2014

AHF: Cardiopatías _____ Trastornos mentales _____ Dificultad
en el aprendizaje _____ LPH _____ malformaciones _____ Crisis
convulsivas _____ Consanguinidad _____ Endogamia _____

APNP: Esquema de vacunación _____ Ablactación _____ Intolerancia alimentaria _____

APN: Gesta _____ Dx embarazo _____ CPN _____ Ingesta de ácido fólico y sulfato ferroso _____
Control de TA _____ Control de glucemia _____ AA _____ IVU _____ CV _____ tx _____
Teratógenos y mutágenos _____
Motilidad fetal _____ USG obstétricos _____
APP _____ Maduración pulmonar _____ RPM _____ Paciente obtenido a las _____
mediante _____ Líquido amniótico _____
Peso _____ Talla _____ Apgar _____ Lloró y respiró al nacer _____ O2
suplementario _____ Cianosis al nacimiento _____ Ictericia _____ Tamiz neonatal _____
Facies asimétrica al llanto _____
Complicaciones _____

DSM: alteraciones de succión _____ Alteraciones de deglución _____ Sonrisa social _____
Seguimiento visual _____ Sostén cefálico _____ Sostén troncal _____ Sedestación _____
Gateo _____ Bipedestación _____ Deambulación _____ Control de esfínteres _____
Come solo _____ Se viste solo _____ Balbucesos _____ Lenguaje _____
Situación escolar _____ Relaciones interpersonales _____
Terapia _____

APP: exantemáticos _____ alérgicos _____
Quirúrgicos: _____ traumáticos: _____
Hospitalizaciones previas: _____ Transfusionales: _____
Audición: _____ Visión: _____ Endocrinológico: _____
Renal: _____ Otros: _____

Valoración cardiológica

Diagnóstico clínico: Fallot
EKG: _____
EcoCG: _____

EXPLORACIÓN FÍSICA

Peso: _____ Talla: _____ PC: _____ DII: _____ DIE: _____ DIP: _____

Craneofacial	Oral
Microcefalia	Comisuras de los labios hacia abajo
Asimetría facial al llanto	Micrognatia
Asimetría facial estructural	Retrognatia
Facies hipotónica	Boca pequeña
Perfil facial plano	Labio hendido
Oftalmológica	Paladar hendido
Estrabismo	Paladar hendido submucoso
Fisuras palpebrales estrechas	Úvula bifida
Fisuras palpebrales hacia arriba	Oligodontia
Coloboma del iris	Adenoides ausentes
Microftalmia	Faringe amplia
Hipertelorismo	Faringe estrecha
Párpados gruesos	Faringe hipotónica
Vasos retineales tortuosos	Insuficiencia velofaríngea
Embriotoxón posterior	Movimiento faríngeo asimétrico
Epicanto	Auriculares
Catarata	Hélix plegado
Nasal	Lóbulos pegados
Puente nasal ancho	Pabellones acopados
Puente nasal prominente	Pabellones pequeños
Punta nasal bulbosa	Asimetría leve de pabellones
Punta nasal bifida	Baja implantación
Narinas estrechas	Otitis media recurrente
Hipoplasia de ala nasi	Hipoacusia conductiva
Dimple nasal	Hipoacusia sensorioneural
Cardiológico	Pits/apéndices preauriculares
CIV	CAE estrecho
CIA	Endocrinológico/Inmune
Atresia o estenosis pulmonar	Hipocalcemia
Tetralogía de Fallot	Hipoparatiroidismo
Aorta hacia la derecha	Pseudohipoparatiroidismo
Tronco arterioso	Hipotiroidismo
PCA	Talla baja
Aorta interrumpida tipo B	Timo ausente o hipoplásico
Coartación aórtica	Hipoplasia de hipófisis
Alteración de válvulas aórticas	Enfermedades autoinmunes
Arterias subclavas aberrantes	Musculoesquelético
Anillo vascular	Escoliosis
Alteración de a. carótida	Hemivértebras
Transposición de grandes vasos	Espina bifida oculta
Atresia tricuspídea	Vértebras en mariposa
Manos y pies	Fusión vertebral
Dedos largos	Osteopenia
Dedos estrechos	Anomalia de Sprengel
Manos y pies pequeños	Dolor crónico en extremidades
Piel áspera	Hipermovilidad articular
Contracturas	Costillas supernumerarias
Pulgares trifalángicos	Fusión costal
Pulgares de implantación alta	Hipotrofia muscular
Polidactilia (pre/postaxial)	Compromiso de médula espinal
Sindactilia cutánea	Alteraciones pulmonares
Pie plano/equinovaro	Alteraciones renales
Neurológico	Enfermedad de Hirschprung
Atrofia cerebral	Hernia inguinal
Disgenesia/hipoplasia cerebelar	Hernia umbilical
Hipotonía generalizada	Malrotación intestinal
Retraso en el desarrollo psicomotor	Hernia diafrágica congénita
Convulsiones	Malformaciones anorrectales
Ataxia cerebelar	Hipospadias
Mielomeningocele	Criptorquidia
Ventriculomegalia	Reflujo genitourinario
Infartos	
CreCIMIENTO y desarrollo	Déficit de atención

Anexo 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

"2012, Año de la Cultura Maya"



SECRETARÍA
DE SALUD

SALUD

Carta de consentimiento para participar en el protocolo de investigación:

"ESTUDIO MOLECULAR DE LA REGIÓN 22q11.2 EN PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DiGEORGE/VELOCARDIOFACIAL"

Investigador responsable:

Dr. David Cruz Robles
Laboratorio de Genómica, Departamento de Biología Molecular,
Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez".

Estimado paciente o tutor:

Por medio de la presente, lo invitamos a participar en el protocolo de investigación mencionado arriba, el cual pretende conocer y entender mejor porque se presenta la enfermedad que tiene (usted o) su hijo. Este estudio intenta analizar las características y los cambios que pudiera haber en el material hereditario que contiene la información para un desarrollo adecuado del corazón, y que tal vez, si se encuentran cambios puedan estos causar alteraciones en este desarrollo. Por ello esta investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en un futuro.

Queremos hacerle saber que participar en esta investigación es totalmente voluntario y que usted puede decidir no participar en el estudio sin que ésta decisión influya negativamente a la prestación a la que tiene derecho en su atención médica o la de su hijo.

Si usted(es) está(n) de acuerdo en participar, dependiendo de la edad y condiciones de salud de usted o su hijo, se les proporcionará una amplia y sencilla explicación de las características del estudio.

En los párrafos siguientes se describe el estudio:



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

"2012, Año de la Cultura Maya"



SECRETARÍA
DE SALUD

SALUD

FINALIDAD DEL ESTUDIO: Su hijo tiene una alteración del desarrollo que aparece como una enfermedad del corazón presente desde el nacimiento (cardiopatía congénita). Se sospecha que estas enfermedades tienen varias causas y una de ellas tiene que ver con alteraciones en el material hereditario, este material contiene la información para desarrollarnos. A la manera en que está arreglada esta información se le llama gen y, en el caso de las cardiopatías congénitas, se piensa que una alteración en algún gen o un cromosoma podría estar alterado el desarrollo normal y esto haría que se presentara la enfermedad. El propósito de este estudio es buscar los posibles cambios en el material genético de su hijo y conocer si este gen está alterado, lo que nos ayudará a saber si realmente este gen tiene alguna participación en causar este tipo de enfermedades.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

Para este estudio, necesitamos tomarle a su hijo, y en su caso a ustedes más adelante, una muestra de sangre, mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- Con una jeringa desechable se le tomará a su hijo una muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente 2ml. Esta muestra será usada para el análisis de la molécula que contiene nuestros genes (ADN).
- 2.- Queremos que sepa, que no daremos a conocer ninguna información acerca de usted ni de su familia que los pueda identificar, debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación.

BENEFICIOS: Se les dará a ustedes asesoramiento genético con toda la información que llegue a integrarse. Su colaboración permitirá obtener conocimiento que tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

"2012, Año de la Cultura Maya"



SECRETARÍA
DE SALUD

SALUD

RIESGOS Y MOLESTIAS: Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio por donde se le extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

COSTOS: Tanto la extracción de muestras de sangre como las pruebas y cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación, así como los resultados no tendrán ningún costo para usted.

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá usted comunicarse con el investigador responsable, al teléfono 55 73 29 11 ext. 1460. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte del investigador responsable, puede usted dirigirse a la Dirección de Investigación del propio Instituto a la ext. 1357.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio de la siguiente manera.

México, D.F. _____ de _____ del _____

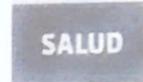


**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
IGNACIO CHÁVEZ**

"2012, Año de la Cultura Maya"



SECRETARÍA
DE SALUD



Nombre y firma del paciente _____

(De ser el caso)

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Parentesco con el paciente

Dirección

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Dirección

**EL PRESENTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO HA SIDO APROBADO PARA USARSE
ENTRE 2012 Y 2014.**