



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE PEDIATRIA  
"DR. SILVESTRE FRENK FREUND"

**"CONCORDANCIA DEL FISH EN MUCOSA ORAL Y EN SANGRE PERIFÉRICA  
EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE DELECIÓN 22q11.2 EN  
PACIENTES DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA "DR. SILVESTRE FRENK  
FREUND" DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI".**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

**Paloma del Carmen Salazar Villanueva**

Tutores:

**Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel**

**Médico Genetista. Departamento de Genética Médica**

**Dra. Luz María Garduño Zarazúa.**

**Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.**



Ciudad de México, Agosto, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

<b>RESUMEN:</b> .....	<b>4</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.</b> .....	<b>7</b>
1.1 CUADRO CLÍNICO.....	8
1.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS: .....	12
1.2.1 FISH.....	13
1.2.2. FISH en mucosa oral.....	15
1.3 ESTUDIOS REALIZADOS EN MÉXICO.....	17
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>19</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
6.1 Objetivo General: .....	20
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
7.2. Diseño del estudio .....	20
7.3. Universo:.....	20
7.4. Tamaño de la muestra: .....	20
7.5. Criterios de selección:.....	20
7.5.1. Criterios de inclusión: .....	20
7.6. Definición operativa de variables:.....	21
7.7 Diseño Experimental.....	23
7.7.1. FISH en sangre periférica.....	24
7.7.2 FISH en células de mucosa oral.....	25
<b>7.8. ASPECTOS ÉTICO-LEGALES</b> .....	<b>27</b>
<b>7.9. RECURSOS, FINANCIAMIENTO, FACTIBILIDAD</b> .....	<b>28</b>
Recursos.....	28
Financiamiento.....	28
Factibilidad.....	28
<b>7.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b> .....	<b>28</b>

<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>9. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>41</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>12. ANEXO 1 .....</b>	<b>47</b>
<b>13. ANEXO 2 .....</b>	<b>49</b>

## **RESUMEN:**

**Introducción:** Los Síndromes de genes contiguos son causados por un número de copia aberrante (ganancia o pérdida) de una región subcromosómica específica. Para algunos de estos síndromes se sabe que muchos genes pueden estar involucrados en la región generalmente duplicada o eliminada, pero solo uno de ellos es sensible a la dosificación de genes y es causante de los signos clínicos específicos. Por lo tanto, la denominación de Síndromes de genes contiguos ha sido reemplazada por la designación de microdelección o síndromes de microduplicación. El síndrome de microdelección 22q11.2 es el más frecuente de este tipo y es una de las causas genéticas más comunes de cardiopatía congénita, responsable del 1.5% al 5% de todas las cardiopatías congénitas al momento del nacimiento. Presenta una prevalencia de aproximadamente 1 en 4000 nacidos vivos. Es causado por una microdelección de 1.5 a 3 Mb, no es observable por citogenética clásica (cariotipo). El mecanismo propuesto que origina la delección es una recombinación homóloga no alélica en una región rica en repeticiones de bajo número de copias (LCR) que predisponen a la recombinación durante la meiosis. El estándar de oro para el diagnóstico del Síndrome de microdelección 22q11.2 es la hibridación *in situ* con fluorescencia con sonda para el gen *TUPLE1*, que se incluye en la región crítica 22q11.2 y sonda *ARSA* 22q13.3, la cual se utiliza como control. Para entender el principio de la hibridación *in situ* con fluorescencia, se debe considerar que el DNA se caracteriza por la complementariedad de las bases de nucleótidos en sus dos cadenas antiparalelas. El FISH representa una metodología para detectar secuencias de nucleótidos específicas mediante el uso de sondas de DNA marcadas con un fluorocromo, la cual se hibrida con la secuencia complementaria en el DNA de la región a estudiar. El uso de FISH en mucosa oral es una alternativa a la obtención de linfocitos en sangre periférica para la investigación de mosaicismo o búsqueda de alteraciones específicas en pacientes en estado crítico.

**Justificación:** La realización de FISH en mucosa oral brinda un resultado en menor tiempo comparado con sangre periférica, ya que no requiere células en cultivo. Actualmente, en los pacientes en los que se ha realizado diagnóstico de Síndrome de microdelección 22q11.2 en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, se ha realizado estudio de FISH en sangre periférica, por lo que al contar con resultados similares en mucosa oral y sangre periférica, se puede justificar establecer el primero de ellos como el método de elección para el diagnóstico de pacientes en estado crítico.

**Planteamiento del problema:** El síndrome de microdelección 22q11.2 es el síndrome de microdelección más frecuente a nivel mundial, dado que la presencia de cardiopatía es una característica clínica presente en por lo menos 75% de los pacientes y es la principal causa de mortalidad (90%) en ellos mismos, se requiere contar con un método de diagnóstico temprano para confirmar el diagnóstico y brindar asesoramiento genético a los padres, así como poder realizar el

seguimiento en cuanto a la búsqueda de otras características clínicas que pueden presentar estos pacientes.

**Pregunta de investigación:** ¿Cuál es la concordancia entre el resultado de FISH en sangre periférica y FISH en mucosa oral en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de microdeleción 22q11.2?

**Hipótesis:** En los pacientes con resultado de FISH positivo para la microdeleción 22q11.2 en sangre periférica se encontrará la misma microdeleción en mucosa oral en al menos 95% de los casos.

**Objetivo:** Determinar la concordancia entre resultado de FISH en mucosa oral y FISH en sangre periférica en pacientes con diagnóstico clínico del síndrome de microdeleción 22q11.2.

**Materiales y Métodos:** Se seleccionarán pacientes de la consulta externa de genética que cuenten con diagnóstico clínico de Síndrome de microdeleción 22q11.2 entre 0 años y 16 años 11 meses, en un período de un año (Enero 2018 a Mayo 2019). Previo consentimiento informado y/o asentimiento, se les tomará una muestra de sangre periférica y muestra de mucosa oral para realización de cariotipo, FISH en sangre periférica y FISH en mucosa oral. En la Unidad de Investigación en Genética Humana se procesarán las muestras de acuerdo a las técnicas correspondientes y se analizarán en el microscopio de fluorescencia. Se registrarán los resultados obtenidos de cada uno de los pacientes con la finalidad de determinar un diagnóstico definitivo y ofrecer asesoramiento genético de forma integral.

**Aspectos éticos y legales:** El presente protocolo se apega a los lineamientos establecidos en la Declaración mundial de Helsinki y en la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos.

**Riesgo de la investigación:** De acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación en el título II, Capítulo primario, artículo 17, este estudio se considera de riesgo mínimo ya que solo se tomará una muestra de sangre periférica y una muestra de mucosa oral.

**Posibles beneficios:** El paciente recibirá un beneficio directo derivado de la realización del estudio, ya que recibirá el diagnóstico de certeza. También se espera que los resultados obtenidos tengan un beneficio global para la sociedad, principalmente la comunidad científica.

**Balance riesgo-beneficio:** Dado que se espera un beneficio global para la sociedad y los riesgos derivados de este estudio son menores (nulos), puede decirse que el balance riesgo- beneficio se inclina hacia el beneficio.

**Confidencialidad:** Toda la información obtenida de cada sujeto a partir de los estudios realizados para este protocolo de tesis será anónimos al asignarse un

número de folio. Todos los datos que identifiquen a los sujetos serán confidenciales.

**Consentimiento informado:** se solicitará consentimiento y/o asentimiento informado para su participación en este estudio.

**Selección de los participantes:** Se seleccionará a los pacientes de acuerdo a si cumplen con el Diagnóstico clínico del Síndrome de microdelección 22q11.2 en un periodo de un año.

**Conflicto de intereses:** No existe ningún conflicto de interés económico o personal dentro del equipo de colaboradores.

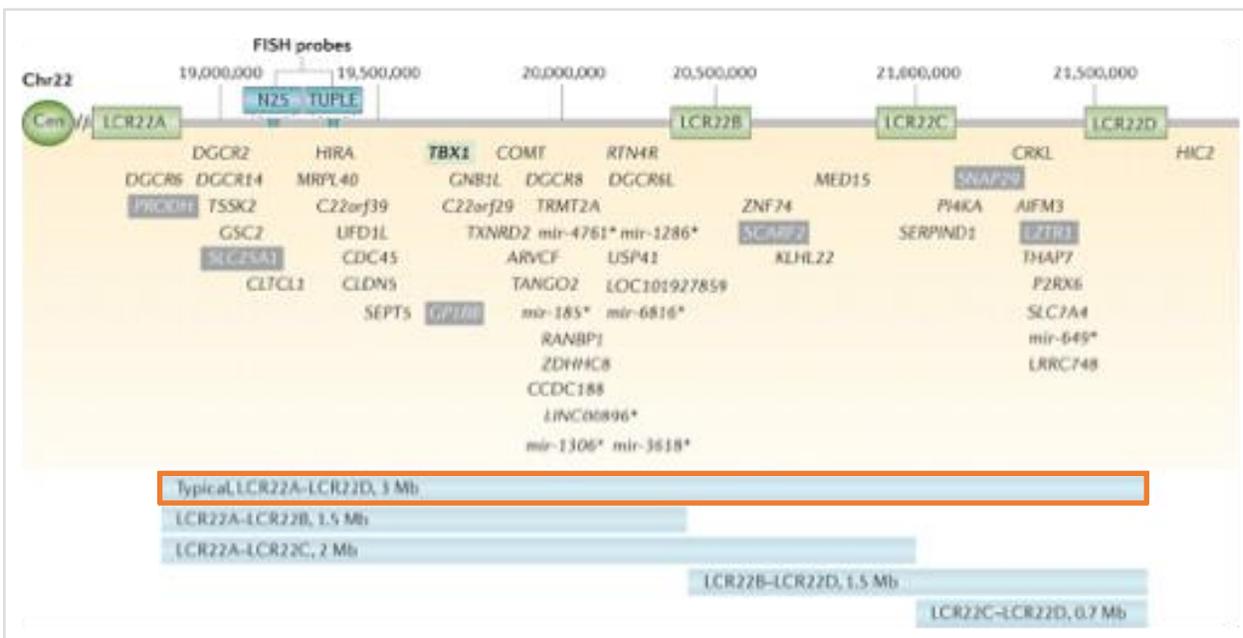
**Recursos e Infraestructura:** Este estudio es factible dado que se cuenta con los recursos humanos y los recursos materiales en el Departamento de Genética Médica y la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.

## 1. MARCO TEÓRICO.

Los Síndromes de genes contiguos son causados por un número de copia aberrante (ganancia o pérdida) de una región subcromosómica específica [1]. Estas regiones puede contener muchos genes, sin embargo, solo uno de ellos puede ser sensible a dosis y ser el causante de los signos clínicos específicos. Debido a lo anterior, la denominación de Síndromes de genes contiguos ha sido reemplazada por síndrome de microdelección o microduplicación [1].

El síndrome de microdelección 22q11.2 es el más frecuente de este tipo y es una de las causas genéticas más comunes de cardiopatía congénita, responsable del 1.5% al 5% de todas las cardiopatías congénitas al momento del nacimiento [2]. Presenta una prevalencia de aproximadamente 1 en 4000 nacidos vivos [3].

El síndrome de microdelección 22q11.2 es causado por una microdelección de 1.5 a 3 Mb, no es observable por citogenética clásica (cariotipo). El mecanismo propuesto que origina la deleción es una recombinación homóloga no alélica en una región rica en repeticiones de bajo número de copias (LCR) que predisponen a la recombinación durante la meiosis [2]. Existen cuatro bloques de LCR en esta región y cada bloque consta de varios módulos de repeticiones que tienen varias longitudes y orientaciones dentro de un bloque. Estos bloques se han denominado LCR A-D, en orden de centrómero a telómero [3].



**Figura 1. Repeticiones de bajo número de copias y genes en el locus 22q11.2**

Fuente: McDonald-McGinn D. M, Sullivan K. E, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman J. A, et al. (2016) 22q11.2 deletion syndrome. Nat Rev Dis Primers.

En la figura 1 se observa la región cromosómica implicada en el Síndrome de microdeleción 22q11.2, nótese que la deleción típica abarca los 4 bloques de LCR, también se muestra la ubicación del locus de la sonda de FISH empleada para el diagnóstico de la deleción.

El 85% de las personas afectadas tienen una deleción típica de 3 Mb, la cual abarca aproximadamente 90 genes, de los cuales 46 codifican para proteínas, 7 microRNA, 10 ncRNA y 27 pseudogenes [9] Aproximadamente el 15% de las personas afectadas tienen deleciones atípicas de 1.5 Mb [2].

Las deleciones típicas y atípicas incluyen el gen *TBX1*. *TBX1* dirige la expresión de *FGF8* y *FGF10*, que son importantes para la supervivencia, la proliferación y la migración de las células de la cresta neural. Además *TBX1* dirige la expresión de *PITX2*. Este factor de transcripción también es importante para el desarrollo craneofacial y asimetría izquierda-derecha para el desarrollo del corazón. La haploinsuficiencia de *TBX1* es responsable de los defectos cardiacos conotruncales en estos casos [2]. *TBX1* también se expresa en el campo cardiaco secundario, que da lugar al tracto de salida cardiaco, al ventrículo derecho y al mesénquima del cerebro [3].

La deleción puede heredarse de una forma autosómica dominante, sin embargo es principalmente un evento *de novo* en el 93% de los casos y en el 7% restante se hereda de uno de los progenitores [2]. El síndrome de deleción 22q11.2 muestra una amplia variabilidad en la penetrancia y la expresividad, por lo que los casos difieren entre sí, incluso entre gemelos monocigóticos [2]. Las razones para la amplia variabilidad en el fenotipo de los gemelos monocigóticos podría ser debido a varios mecanismos, tales como el tamaño de la deleción, mosaicismo somático, variantes en el número de copias (CNV), diferencias en los cambios epigenéticos, así como diferencias en el entorno intrauterino [4].

### **1.1 CUADRO CLÍNICO.**

A principios de los años noventa los estudios de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), identificaron deleciones en 22q11.2 como la causa más frecuente de Síndrome de DiGeorge. Los pacientes con este síndrome cursaban con inmunodeficiencia, hipoparatiroidismo y cardiopatía congénita. Esto precedió el reconocimiento de varias condiciones aparentemente no relacionadas, en las cuales se detectó una deleción en 22q11.2, incluyendo: Síndrome Velocardiofacial, Síndrome de cara-anomalía conotruncal, Síndrome de Opitz G/BBB y Síndrome Cayler Cardiofacial [5].

El término síndrome de microdeleción 22q11.2 se usa cuando se refiere a pacientes que tienen la deleción y se utiliza una nomenclatura sindrómica específica cuando los datos se basan en características clínicas [3].

En las siguientes tablas se muestran las características clínicas más frecuentes y menos frecuentes reportadas en el síndrome de microdelección 22q11.2 (Tabla 1 y Tabla 2).

**Tabla 1.**

Características clínicas más frecuentes en los pacientes con Síndrome de microdelección 22q11.2

<b>CARACTERÍSTICA CLÍNICA</b>	<b>FRECUENCIA</b>
Defecto cardíaco (conotruncales)	75%
Anomalías palatinas	75%
Inmunodeficiencia	75%
Dificultades en el aprendizaje	70% - 90%
Hipocalcemia	50%
Anomalías gastrointestinales	30%
Anomalías genitourinarias	30%

**Nota.** Fuente: McDonald-McGinn D. M, Sullivan K. E, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman J. A, et al. (2016) 22q11.2 deletion syndrome. Nat Rev Dis Primers.

**Tabla 2.**

Características clínicas menos frecuentes en los pacientes con Síndrome de microdelección 22q11,2

Retraso del crecimiento intrauterino	Hipoacusia (conductiva y neurosensorial)
Talla baja	Anomalías oftalmológicas (estrabismo, embriotoxón posterior, vasos retinianos tortuosos, esclerocornea, coloboma retiniano o microftalmía)
Atresia esofágica o fístula traqueoesofágica	Anomalías esqueléticas (escoliosis con o sin anomalías vertebrales, polidactilia, camptodactilia, aracnodactilia, sindactilia y craneosinostosis)
Malrotación intestinal, ano imperforado, Enfermedad de Hirschsprung	Convulsiones (idiopáticas o asociadas con hipocalcemia)
Enfermedades autoinmunes (Artritis reumatoide juvenil, trombocitopenia idiopática, anemia hemolítica, enfermedad tiroidea)	Tumores malignos (raros): Hepatoblastoma, tumor de Wilms, carcinoma de células renales, carcinoma de tiroides, leucemia, neuroblastoma y melanoma
Hipotiroidismo	Enfermedades psiquiátricas / Autismo
Deficiencia de hormona del crecimiento	

**Nota.** Fuente: McDonald-McGinn D. M, Sullivan K. E, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman J. A, et al. (2016) 22q11.2 deletion síndrome. Nat Rev Dis Primers.

Las alteraciones cardíacas pueden ser muy variadas pero como se muestra en la siguiente tabla las alteraciones conotruncales son los más frecuentes y es la principal causa de mortalidad en estos pacientes (Tabla 3).

**Tabla 3**

Cardiopatías congénitas más frecuentes reportadas en pacientes con Síndrome de microdelección 22q11.2

<b>CARDIOPATIA</b>	<b>PORCENTAJE DE INDIVIDUOS AFECTADOS</b>
Tetralogía de Fallot	20%
Arco aórtico interrumpido tipo B	13%
Defecto septal ventricular (DSV)	14%
Tronco arterioso	6%
Anillo vascular	5.5%
Defecto septal atrial (DSA)	3.5%
DSV; DSA	4%
Otros *	10%
Normal	24%

**Nota.** Fuente: McDonald-McGinn DM, Kohut T, Zackai EH. Deletion 22q11.2 (velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome). In: Cassidy SB, Allanson JE, eds. Management of Genetic Syndromes. 3 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010b:263-84.

\*Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico; estenosis valvular pulmonar; ventrículo derecho de doble salida; válvula aórtica bicúspide; heterotaxia / canal A-V, transposición de los grandes vasos; atresia aislada de la arteria pulmonar derecha; dilatación de la raíz aórtica; arterias subclavias aberrantes.

## 1.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS:

La deleción se puede detectar utilizando Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH) (con sonda TUPLE1 para la región crítica) [6] o la sonda N25 (Vysis) [7]. También existe kit de MLPA para 22q11.2, el cual permite detectar deleciones atípicas e indica con precisión el número de copias alélicas. También se ha evaluado el uso de hibridación genómica comparativa basada en arreglos (aCGH) como otra herramienta eficiente para identificar desequilibrios cromosómicos como deleciones y duplicaciones de 22q11.2. aCGH detecta cambios en el número de copias en pacientes con fenotipos no clásicos [6]. Por otra parte, es necesario también realizar el estudio de cariotipo bandas GTG para descartar que los pacientes tengan rearrreglos cromosómicos involucrados en la región de la deleción o alguno otro rearrreglo que pueda modificar el fenotipo del paciente.

El estándar de oro para el diagnóstico del Síndrome de microdeleción 22q11.2 es la hibridación *in situ* con fluorescencia con sonda para el gen *TUPLE1*, que se incluye en la región crítica 22q11.2 y sonda ARSA 22q13.3, la cual se utiliza como control [6,8] (Figura 2). Aunque esta metodología permite detectar la deleción, presenta sus limitantes pues no podemos determinar el tamaño exacto de la pérdida, para esto, es necesario utilizar otras herramientas moleculares como MLPA o Microarreglos.

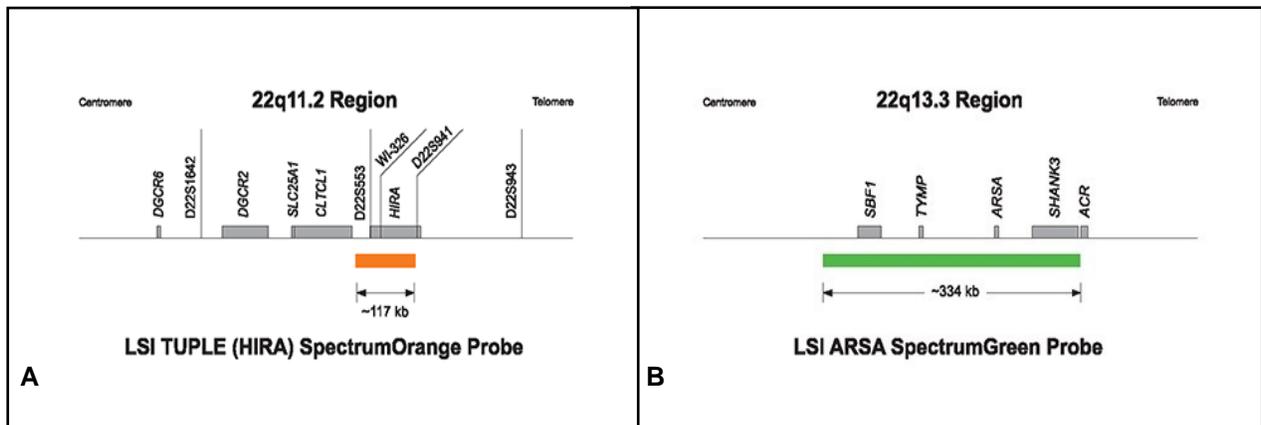


Figura 2. Vysis DiGeorge Region Probe. A) LSI TUPLE 1 Spectrum Orange. B) LSI ARSA Spectrum Green

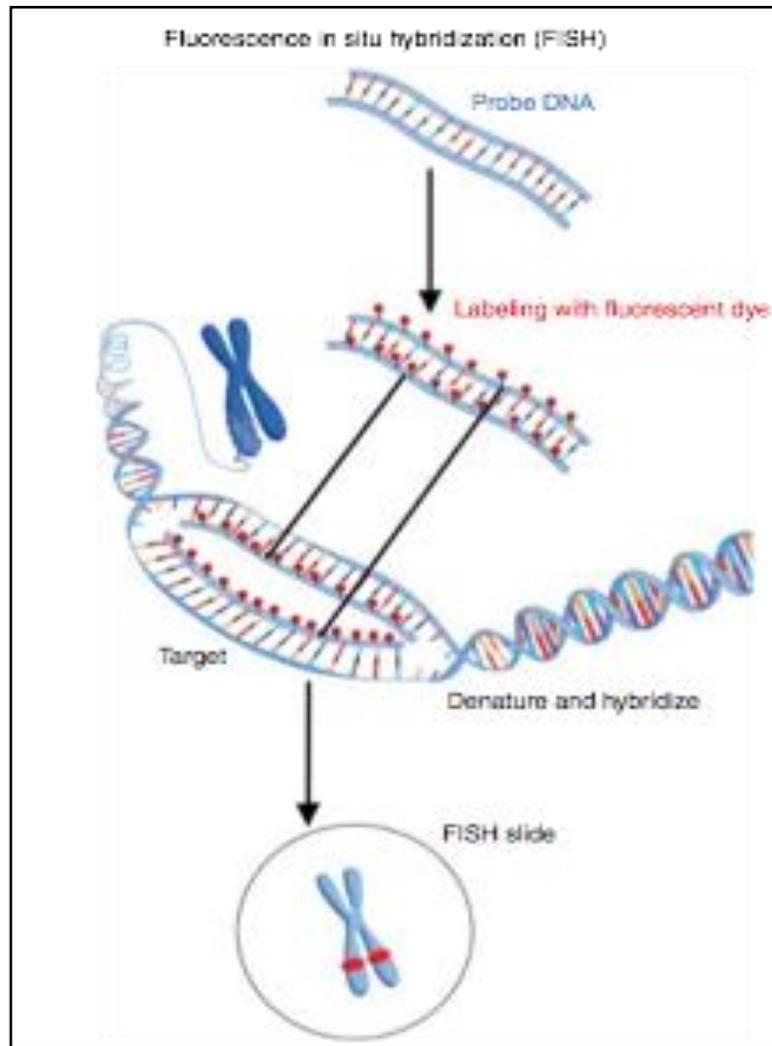
Fuente: <https://www.molecular.abbott/int/en/chromosome/22>

### 1.2.1 FISH.

Para entender el principio de la hibridación *in situ* con fluorescencia, se debe considerar que el DNA se caracteriza por la complementariedad de las bases de nucleótidos en sus dos cadenas antiparalelas [9]. El FISH representa una metodología para detectar secuencias de nucleótidos específicas mediante el uso de sondas de DNA marcadas con un fluorocromo, la cual se hibrida con la secuencia complementaria en el DNA de la región a estudiar [10].

Las bases nitrogenadas en la doble cadena de DNA se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno débiles, estos pueden romperse con calor o pH alcalino y formar dos cadenas de DNA de hebra sencilla. Esta separación se denomina desnaturalización o disociación del DNA (Figura 3). Cuando las hebras se enfrían y si las condiciones de sal son correctas, los enlaces de hidrógeno específicos de la base se formarán nuevamente y el DNA volverá a ser de doble cadena, con los enlaces G-C y A-T. Esto se denomina renaturalización o reasociación del DNA. Si hay DNA presente que coincida con una secuencia de DNA desnaturalizada, puede renaturalizarse con la hebra, incluso si no es la hebra original complementaria. La adición de una sonda de DNA a una muestra objetivo puede dar lugar a un DNA híbrido. La sonda esta marcada con un fluorocromo que permite la visualización de la ubicación de la secuencia complementaria de la sonda. Usando un microscopio de fluorescencia, habrá un punto o puntos brillantes (señales) en el núcleo o los cromosomas en metafase, donde la sonda marcada con fluorescencia se híbrido con una célula en el portaobjetos ("*in situ*") [10].

Mediante esta metodología se pueden detectar alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas utilizando sondas específicas de locus, de centrómero, subteloméricas y cromosoma completo [11]. Una sonda fluorescente puede hibridarse en cromosomas en metafase o interfase de linfocitos, fibroblastos, células de líquido amniótico, células de mucosa oral, esperma, secciones de tejido de parafina fijadas en formalina y fibras de cromatina [12].



**Figura 3. Procedimiento del FISH**

Fuente: Arsham M. S, Barch M. J, Lawce H. J. (2017). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. John Wiley & Sons.

La sonda de FISH es una secuencia de nucleótidos de DNA que cubren una región específica del genoma. La longitud de la sonda se mide en kilobases (kb), megabases (Mb) o pares de bases (pb). La longitud mínima de la sonda para FISH es de alrededor de 50 kb, mientras que las sondas más grandes pueden cubrir más de 1 Mb, pero la mayoría de las sondas suelen ser de alrededor de 200-400 kb [10].

La hibridación con la sonda da como resultado dos señales en cada cromosoma (sonda problema y sonda control) en pacientes sin la alteración. En pacientes con la alteración se observan dos señales que corresponden a la sonda control y una señal de la sonda problema (cromosoma normal) [6]. La delección también se puede identificar en células en interfase.

### **1.2.2. FISH en mucosa oral.**

El uso de FISH en mucosa oral es una alternativa a la obtención de linfocitos en sangre periférica para la investigación de mosaicismo o búsqueda de alteraciones específicas en pacientes en estado crítico. En un estudio realizado por Juliana de Paulo et al. en el 2014, encontraron una similitud en la detección de mosaicismo para una segunda línea celular 45,X en pacientes con Anomalías del desarrollo sexual 46,XY por medio de FISH en células de mucosa oral y el análisis de linfocitos en sangre periférica [13].

Podemos mencionar que este es un método rápido para la detección de microdeleciones, basados en reportes previos, como el realizado por Nieuwint et.al., en 3 pacientes que habían sido diagnosticados con Síndrome de Williams y 3 pacientes con síndrome de microdelección 22q11.2 con FISH en muestra de sangre periférica. Utilizaron FISH en frotis de mucosa oral utilizando sondas para 7q11.23 y 22q11.2. Además se realizó dicho estudio en 4 controles sanos. Detectaron el número correcto de señales con la sonda para síndrome de Williams en 94.9% y con la sonda 22q11.2 en 94.1%. En este estudio se mostró que el FISH en mucosa oral se puede realizar para la detección de síndromes de microdelección debido a que se obtuvieron resultados confiables [14].

El uso de FISH en mucosa permite el aprovechamiento de recursos humanos al reducir el tiempo de análisis, además de que es un método menos invasivo (Tabla 4). En una muestra rica en linfocitos, el análisis de 100 células demanda cerca de 4 horas, mientras que el recuento de 1000 células de mucosa se puede realizar en aproximadamente 3 horas. La desventaja del FISH en mucosa oral es la necesidad de procesar la muestra luego de la recolección, por la posible contaminación por bacterias, normalmente presentes en la cavidad oral [13].

**Tabla 4**

Información comparativa del uso de FISH en sangre periférica y el uso de FISH en mucosa oral

<b>FISH en sangre periférica</b>	<b>FISH en mucosa oral</b>
Invasiva	No invasiva
Muestra con menor probabilidad de contaminación (se añade antibiótico al medio de cultivo)	Muestra con probable contaminación por bacterias
Obtención de resultado en > 72 horas	Obtención de resultado en < 48 horas
Requiere medio de cultivo	No se necesita medio de cultivo, no requiere células en división

### 1.3 ESTUDIOS REALIZADOS EN MÉXICO.

**Tabla 5**

Estudios realizados en pacientes con Síndrome de delección 22q11.2 en México.

Título	Lugar de realización del estudio	Número de pacientes	Resultados
Análisis clínico y citogenético molecular en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome velocardiofacial atendidos en el Hospital infantil de México Federico Gómez de Junio 2008 a Mayo 2010	Hospital infantil de México Federico Gómez	62 pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de delección 22q11.2	Positivos: 27 (43.5%) Negativos 35 (56.5%)
Estudio citogenético mediante FISH en pacientes con probable Síndrome de delección 22q11.2 utilizando dos sondas: TUPLE y N25	Departamento de medicina Genómica CENIAQ  (Enero 2015-Diciembre 2017)	34 pacientes con probable Síndrome de delección 22q11.2	Sonda TUPLE1:  Positivos: 13 (38%) Negativos: 21 (62%)  Sonda N25:  Negativos: 21
Diagnosticar mediante la técnica de FISH a pacientes con probable delección 22q11.2 utilizando sonda TUPLE	Laboratorio de Citogenética molecular de Medicina Genómica CENIAQ  (Enero 2014-Diciembre 2014)	4 pacientes con probable Síndrome de delección 22q11.2	Negativos:  4 pacientes

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La realización de FISH en mucosa oral brinda un resultado en menor tiempo comparado con sangre periférica, ya que no requiere células en cultivo. Actualmente, en los pacientes en los que se ha realizado diagnóstico de Síndrome de microdeleción 22q11.2 en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, se ha realizado estudio de FISH en sangre periférica, por lo que al contar con resultados similares en mucosa oral y sangre periférica, se puede justificar establecer el primero de ellos como el método de elección para el diagnóstico oportuno de pacientes en estado crítico.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El síndrome de microdelección 22q11.2 es el síndrome de microdelección más frecuente a nivel mundial, dado que la presencia de cardiopatía es una característica clínica presente en por lo menos 75% de los pacientes y es la principal causa de mortalidad (90%) en ellos mismos, sería ideal contar con un método de diagnóstico temprano, menos invasivo y con menor costo para confirmar el diagnóstico y brindar asesoramiento genético a los padres, así como poder realizar el seguimiento en cuanto a la búsqueda de otras características clínicas que pueden presentar estos pacientes.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la concordancia entre el resultado de FISH en sangre periférica y FISH en mucosa oral en pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de microdelección 22q11.2?

## **5. HIPÓTESIS**

En los pacientes con resultado de FISH positivo para la microdelección 22q11.2 en sangre periférica se encontrará la misma microdelección en mucosa oral en al menos 95% de los casos.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General:**

Determinar la concordancia entre resultado de FISH en mucosa oral y FISH en sangre periférica en pacientes con diagnóstico clínico del síndrome de microdelección 22q11.2.

### **6.2 Objetivo Específico:**

Determinar la concordancia entre el resultado de FISH en mucosa oral y FISH en sangre periférica mediante el índice kappa.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

**7.1. Lugar de realización del estudio:** Departamento de Genética y Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**7.2. Diseño del estudio:** Transversal, Analítico, Descriptivo y Ambispectivo.

**7.3. Universo:** Pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de microdelección 22q11.2 entre 0 años y 16 años 11 meses del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, atendidos en un período de un año (Enero 2018 a Mayo 2019)

**7.4. Tamaño de la muestra:** no probabilístico de casos consecutivos.

**7.5. Criterios de selección:**

### **7.5.1. Criterios de inclusión:**

1. Individuos de uno u otro sexo entre 0 a 16 años 11 meses con diagnóstico clínico de síndrome de microdelección 22q11.2

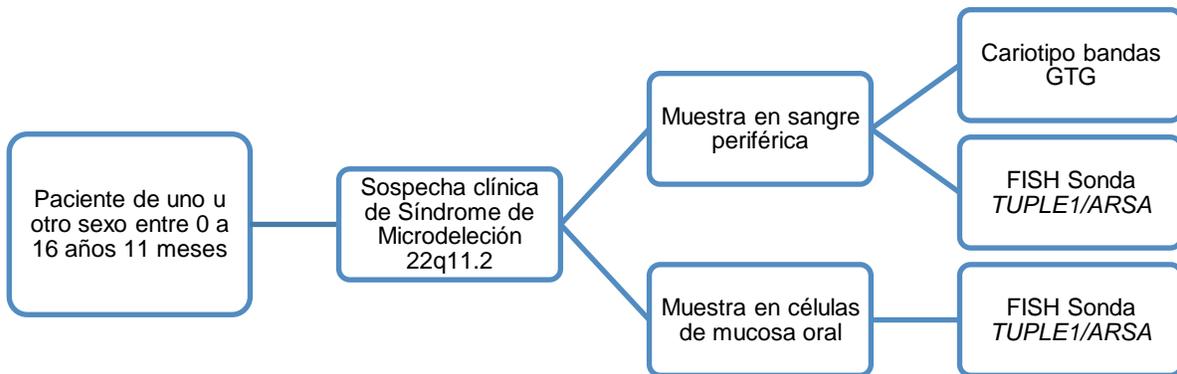
## 7.6. Definición operativa de variables:

<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>				
	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Unidad de medición</b>
<b>Edad</b>	Tiempo que ha vivido una persona, animales o vegetales.	Se registrará la edad expresada en años y/o meses al momento de la firma del consentimiento informado	Cuantitativa	Discontinua (años cumplidos al momento de la inclusión)
<b>Sexo</b>	Conjunto de seres pertenecientes a un mismo sexo	Registrado como masculino o femenino.	Cualitativa	Dicotómica Hombre o mujer.
<b>Cuadro clínico de Síndrome de microdelección 22q11.2</b>	Síndrome de microdelección, el cual cursa con una variedad de signos clínicos como cardiopatía congénita, anomalías palatinas, hipocalcemia, inmunodeficiencia y dificultades en el aprendizaje.	Información consignada en el expediente clínico que permita integrar el diagnóstico clínico.	Cualitativa	Dicotómica. Presente o ausente

**VARIABLES INDEPENDIENTES**

	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Unidad de medición</b>
<b>Resultado de FISH en sangre periférica</b>	<p>Metodología para detectar secuencias de nucleótidos específicas mediante el uso de sondas de DNA marcadas con un fluorocromo, la cual se hibrida con la secuencia complementaria en el DNA de la región a estudiar .</p>	<p>Número de señales de la sonda LSI TUPLE1 color naranja y sonda LSI ARSA color verde presentes en cada núcleo y/o metafase</p>	Cualitativa	Presencia y/o ausencia
<b>Resultado de FISH en mucosa oral</b>	<p>Metodología para detectar secuencias de nucleótidos específicas mediante el uso de sondas de DNA marcadas con un fluorocromo, la cual se hibrida con la secuencia complementaria en el DNA de la región a estudiar.</p>	<p>Número de señales de la sonda LSI TUPLE1 color naranja y sonda LSI ARSA color verde presentes en cada núcleo</p>	Cualitativa	Presencia y/o ausencia

## 7.7 Diseño Experimental.



### **7.7.1. FISH en sangre periférica**

De acuerdo a la metodología propuesta por Helen J. Lawce and Jeffrey S. Sanford en Fluorescence *in situ* hybridization (FISH); 2017, modificado por Garduño Zarazúa.

Procedimiento:

#### A) Preparación de laminillas

Remoje los portaobjetos en etanol al 70% para eliminar los residuos. Limpie los portaobjetos con una gasa limpia.

Preparar laminillas con una suspensión de células más densa 2–3 gotas de la muestra para el análisis regular, utilizando 1–2 gotas de recubrimiento fijador.

Revisar al microscopio de contraste de fases el área de hibridación (de 3-5 metafases por campo, sin citoplasma).

#### B) Pretratamiento

Solución de 2XSSC a una temperatura de 37°C

Coloque las laminillas en solución 2XSSC durante una hora

Coloque las laminillas en etanol al 70%, al 80% y absoluto durante 2 minutos en cada uno y dejar secar a temperatura ambiente.

#### C) Codesnaturalización e hibridación.

1. Apague las luces.

2. Descongele la sondas y el buffer de hibridación y permita que llegue a temperatura ambiente.

3. Prepare las sondas de acuerdo con la sección de soluciones.

4. Encienda ThermoBlock y programe a 73°C

5. Coloque agua destilada entre los carriles de la platina del ThermoBlock

6. Agregue 2.5 µL de mezcla de sonda a cada portaobjetos y cubra con un cubreobjetos (22 × 22 mm).

7. Sellar la laminilla con cemento "Iris". Este se aplica con una jeringa sin aguja alrededor del cubreobjetos.

8. Coloque las laminillas en el ThermoBlock por 5 minutos

9. Coloque las laminillas en una cámara húmeda en la oscuridad a 37 °C durante 8-24 horas.

10. Encienda las luces de nuevo.

D) Lavado post-hibridación y contratinción.

Encienda el baño maría de agua y coloque la solución 0.4XSSC-0.3% NP40 vaso coplin y esperar a que suba la temperatura a 73.5 °C para el lavado posterior a la hibridación.

Mantener el baño maría a una temperatura de 73-75°C por lo menos 30 minutos.

3. Coloque solución 2XSSC-0.1% NP40 vaso coplin y deje a temperatura ambiente durante un minuto.

4. Apague las luces de la habitación.

5. Retirar el cemento "Iris" de cada laminilla y colocar 10 minutos en una solución de 2XSSC a 37°C.

6. Coloque las laminillas en la solución 0.4XSSC-0.3% NP40 a 73-75 °C durante 2 minutos, agitando al momento de colocar la laminilla en el recipiente.

7. Retire las laminillas de la solución anterior y colóquelo en el recipiente a temperatura ambiente de 2XSSC-0.1% NP40, durante 1 minuto.

8. Enjuagar la laminilla durante 10 segundos en agua a temperatura ambiente.

9. Dejar secar la laminilla en la oscuridad.

10. Agregue 3.5 µL de DAPI a la laminilla y colocar un cubreobjetos.

11. Sellar con barniz los bordes del cubreobjetos

12. Almacenar en refrigerador para preservar la fluorescencia.

### **7.7.2 FISH en células de mucosa oral**

a) Pre tratamiento de la muestra

1. La muestra debe ser recolectada en un tubo que contenga 5 mL solución PBS (0.1 mL de antibiótico o antimicótico)

Pre-incubar a 37°C la Solución hipotónica + preparar la tripsina e incubar + Preparar solución Carnoy y mantenerla fría.

2. Resuspender la muestra (células de mucosa oral) en el tubo con el Vortéx.

3. Centrifugar la muestra a 8000 rpm durante 10 min y retirar el sobrenadante.
  4. Agregar al tubo 2.5 mL de Tripsina al 0.05% e incubar a 37°C durante 15 min.
  5. Centrifugar la muestra a 8000 rpm durante 10 min y retirar el sobrenadante.
  6. Resuspender el pellet en 5mL de Sol. Hipotónica e incubar a 37°C por 30 min.
  7. Agregar 1 mL o 10 gotas de Fijador (Fx) o Sol Carnoy Frio mezclar por inversión e incubar 2 min a T.A.
  8. Centrifugar 5 min a 8000 rpm y retirar el sobrenadante.
  9. Agregar el Fx hasta 5 mL mezclar o resuspender en el Vortéx (cuidar que el botón sea visible)
  10. Repetir pasó 8 y 9
  11. Retirar sobrenadante hasta 0.5mL y resuspender en Fx la muestra.  
Resuspender en 2mL del Fx la muestra para gotear (agua de Limón)
- b) Preparación de laminillas
- Previamente preparar la cámara de hibridación y preincubar a 37 °C
1. Conectar la parrilla y humedecer la gasa posteriormente encender la parrilla
  2. Resuspender la muestra con la pipeta.
  3. Tomar un portaobjetos limpio del alcohol frio y limpiarlo con una gasa.
  4. Sobre el portaobjetos poner una cama de Fx y escurrir sin dejar secar.
  5. Gotear 3 veces la muestra sobre el mismo punto del portaobjetos.
  6. Colocar sobre la plancha hasta que seque.
  7. Lavar con una cama de fijador y devolver a la plancha.
- Dejar secar y revisar la laminilla al microscopio (marcar área de hibridación).
- c) Tratamiento Pre-Hibridación
1. Colocar las laminillas (30min -1hr) en 2xSSC a 37°C
  2. Colocar las laminillas en Pepsina (2.5mg en 50 mL de HCL 0.01N) durante 40 min.
  3. Lavar con PBS 5min
  4. Revisar la laminilla al Microscopio (Se debe asemejar a un huevo estrellado).
  5. Montar el tren de ETOH
    - 2 min en ETOH 75%
    - 2 min en ETOH 80%
    - 2 min en ETOH 100%

6. Dejar secar

d) Codesnaturalización e Hibridación

1. Colocar sonda en el centro y colocar el cubreobjetos
2. Sellar con Cemento IRIS
3. Colocar sobre la plancha para laminillas del Termoblock durante 5 min a 73 °C
4. Colocar las laminillas en la cámara de hibridación a 37°C de 8 a 24 hrs.
5. Para retirar el cubreobjetos se debe colocar en Sol 2xSSC a 37°C de 10 a 15 min.

e) Lavados post-hibridación.

1. Colocar en baño maría a 73°C la solución 0.4xSSC 0.3% NP40.
2. Meter la laminilla por 2 min en la solución 0.4xSSC 0.3% NP40 y AGITAR levemente.
3. Pasar la laminilla a una solución 2xSSC 0.1% NP40 a T.A por 1 min y AGITAR levemente.
4. Lavar con agua la laminilla y dejar secar en un lugar ausente de luz
5. Agregue 3.5 µL de DAPI a la laminilla y colocar un cubreobjetos.
5. Observar al microscopio.

Para almacenar las laminillas deben colocarse en un lugar ausente de luz en congelador en una temperatura de 0 a 4°C.

## 7.8. ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

El presente protocolo se apega a los lineamientos establecidos en la Declaración mundial de Helsinki y en la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos.

**Riesgo de la investigación:** De acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación en el título II, Capítulo primario, artículo 17, este estudio se considera de riesgo mínimo ya que solo se tomará una muestra de sangre periférica y una muestra de mucosa oral.

**Posibles beneficios:** El paciente recibirá un beneficio directo derivado de la realización del estudio, ya que recibirá el diagnóstico de certeza. También se espera que los resultados obtenidos tengan un beneficio global para la sociedad, principalmente la comunidad científica.

**Balance riesgo-beneficio:** Dado que se espera un beneficio global para la sociedad y los riesgos derivados de este estudio son menores (nulos), puede decirse que el balance riesgo- beneficio se inclina hacia el beneficio.

**Confidencialidad:** Toda la información obtenida de cada sujeto a partir de los estudios realizados para este protocolo de tesis será anónimos al asignarse un

número de folio. Todos los datos que identifiquen a los sujetos serán confidenciales.

**Consentimiento informado:** se solicitará consentimiento y/o asentimiento informado para su participación en este estudio.

**Selección de los participantes:** Se seleccionará a los pacientes de acuerdo a si cumplen con el Diagnóstico clínico del Síndrome de microdelección 22q11.2 en un periodo de un año.

**Conflicto de intereses:** No existe ningún conflicto de interés económico o personal dentro del equipo de colaboradores.

## **7.9. RECURSOS, FINANCIAMIENTO, FACTIBILIDAD**

### **Recursos.**

- Humanos: Investigadores

- Materiales:

- Sondas de FISH Vysis DiGeorge Región Probe LSI TUPLE 1 Spectrum Orange/LSI ARSA Spectrum Green y demás reactivos para la preparación de soluciones

- Microscopio óptico de fluorescencia y lámpara de mercurio

### **Financiamiento.**

La Unidad de Investigación Médica en Genética Humana cuenta con las sondas de FISH y los reactivos que serán empleadas para el estudio.

### **Factibilidad.**

Este estudio es factible dado que se cuenta con los recursos humanos y los recursos materiales en el Departamento de Genética Médica y la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.

## **7.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

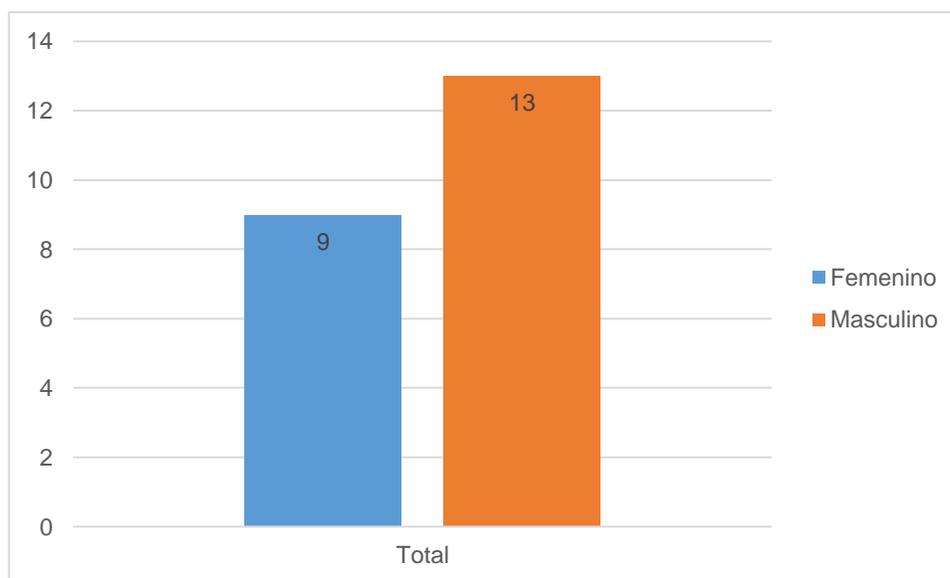
El índice Kappa resume la concordancia entre dos medidas de una misma variable, cuando está en una escala cualitativa, eliminando la fracción de la concordancia debida al azar, es decir, la que se obtendría si las dos mediciones no estuvieran relacionadas. La fórmula es:

$$\text{Kappa} = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

Siendo  $P_o$  la proporción total de concordancia observada y  $P_e$  la proporción de concordancia esperada por el azar.

## 8. RESULTADOS.

El número de pacientes incluidos en el presente estudio fue de 22, atendidos en el Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS en un período comprendido de Enero 2018 a Mayo 2019, de los cuales 9 son mujeres (40.9%) y 13 son hombres (59.09%), como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Frecuencia por sexo de los pacientes analizados.

En relación a la edad de los pacientes analizados, observamos que fue más frecuente el grupo de edad de un 1 mes a 12 meses (31.8%), seguido del grupo de neonatos (<1 mes) y el grupo de escolares (6 años – 12 años), ambos con una frecuencia de 22.7%, como se observa en la tabla 6 y en la figura 5.

**Tabla 6.**

Edad y frecuencia de los pacientes.

EDAD	FRECUENCIA
<1 mes	5 (22.7%)
1 mes - 12 meses	7 (31.8%)
1 año - 5 años	4 (18.1%)
6 años - 12 años	5 (22.7%)
> 12 años	1 (4.5%)
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>

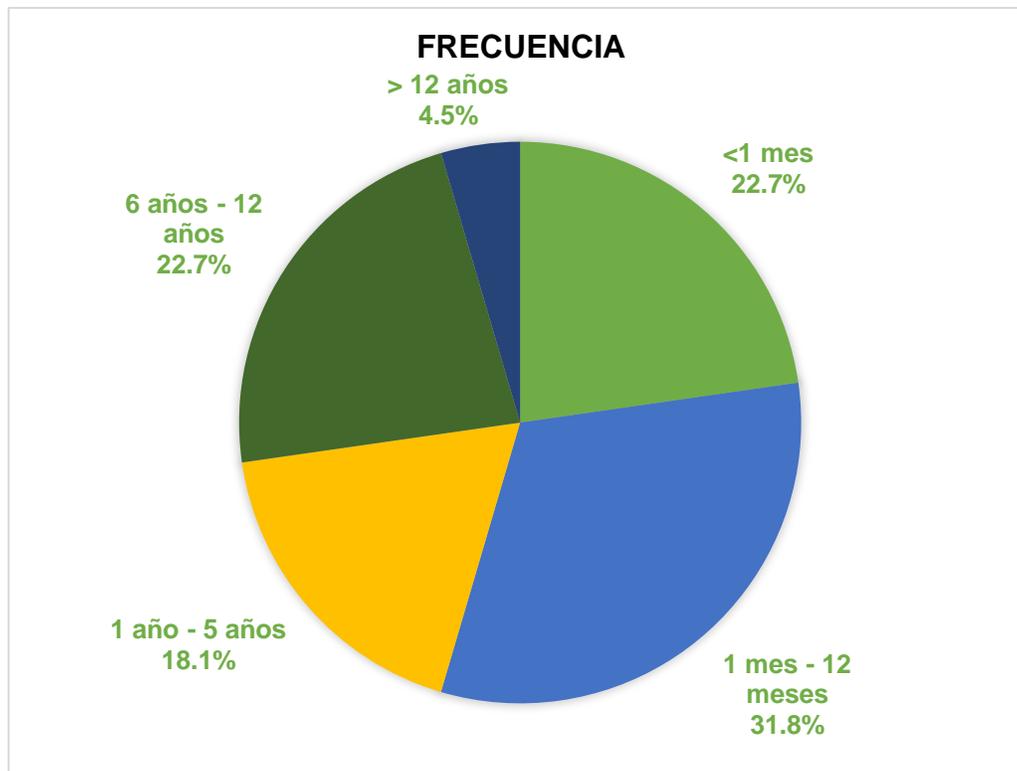


Figura 5. Frecuencia por edad de los pacientes analizados.

Se determino la concordancia entre el resultado de FISH en sangre periférica y de FISH en mucosa oral en pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de microdelección 22q11.2.

Se realizó una tabla de datos, donde se muestra el resultado de ambas pruebas (Tabla 7). Podemos observar que el resultado obtenido del FISH en sangre periférica fue el mismo que el resultado del FISH en mucosa oral en cada uno de los pacientes.

Tabla 7.

Resultado de FISH en sangre periférica y FISH en mucosa oral.

PACIENTE	FISH EN SANGRE PERIFÉRICA	FISH EN MUCOSA ORAL
1	Negativo a deleción	Negativo a deleción
2	Positivo a deleción	Positivo a deleción
3	Negativo a deleción	Negativo a deleción
4	Positivo a deleción	Positivo a deleción
5	Positivo a deleción	Positivo a deleción
6	Positivo a deleción	Positivo a deleción
7	Positivo a deleción	Positivo a deleción
8	Negativo a deleción	Negativo a deleción
9	Negativo a deleción	Negativo a deleción

10	Positivo a delección	Positivo a delección
11	Negativo a delección	Negativo a delección
12	Positivo a delección	Positivo a delección
13	Positivo a delección	Positivo a delección
14	Negativo a delección	Negativo a delección
15	Negativo a delección	Negativo a delección
16	Positivo a delección	Positivo a delección
17	Negativo a delección	Negativo a delección
18	Negativo a delección	Negativo a delección
19	Negativo a delección	Negativo a delección
20	Negativo a delección	Negativo a delección
21	Negativo a delección	Negativo a delección
22	Positivo a delección	Positivo a delección

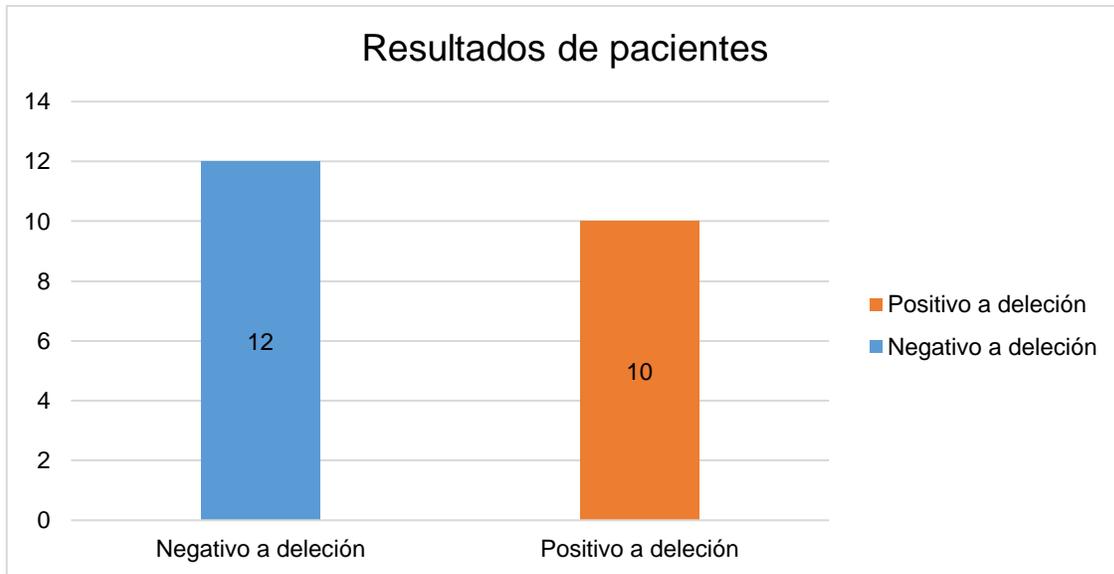
La prueba estadística utilizada para determinar la concordancia fue el índice kappa.

FISH en sangre periférica	FISH en mucosa oral		Total general
	Negativo a delección	Positivo a delección	
Negativo a delección	12		12
Positivo a delección		10	10
<b>Total general</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>22</b>

El índice kappa es de 1, que se interpreta como una concordancia perfecta.

Índice kappa	1
Error estándar	0
Fuerza de la concordancia	Perfecta

En relación a los resultados obtenidos de FISH en sangre periférica y en mucosa oral de los 22 pacientes estudiados, 12 fueron negativos a delección 22q11.2 y 10 fueron positivos a delección 22q11.2.

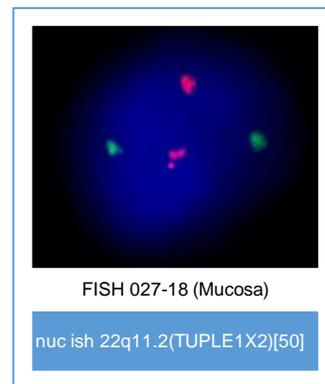
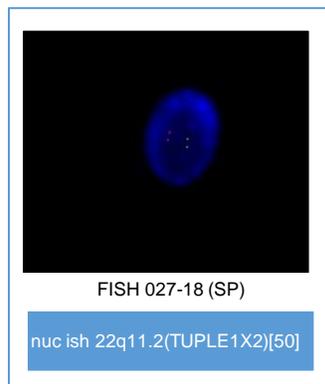
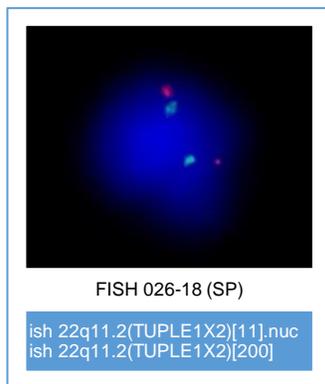


**Figura 6.** Resultados de paciente.

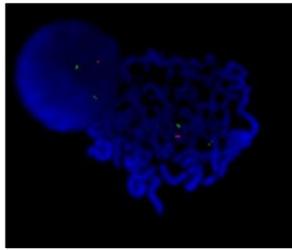
En las siguientes figuras mostramos las fotografías de FISH en sangre periférica y de FISH en mucosa oral de cada uno de los pacientes, así como su resultado es su respectiva nomenclatura de acuerdo al ISCN 2016.

En cada una de las imágenes la señal naranja corresponde a LSI TUPLE1 y la señal verde corresponde a LSI ARSA.

Paciente 1

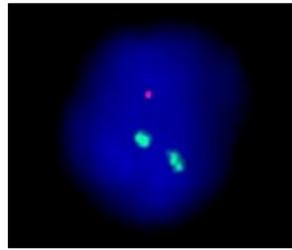


Paciente 2



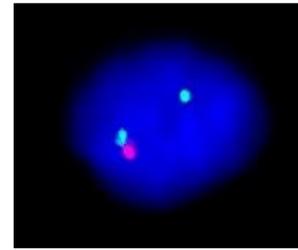
FISH 028-18 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)  
[8].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]



FISH 036-18 (SP)

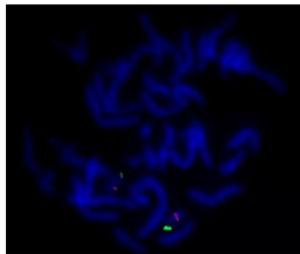
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]



FISH 036-18 (Mucosa)

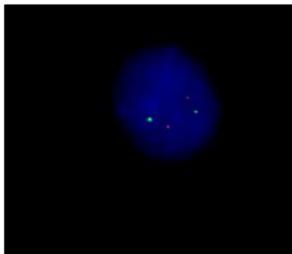
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]

Paciente 3



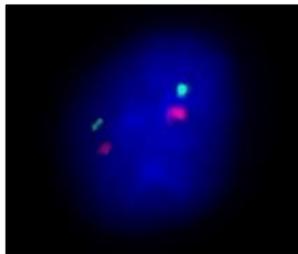
FISH 029-18 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[8].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[114]



FISH 029-18 (SP)

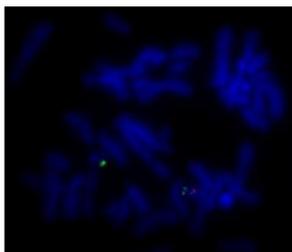
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[8].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[114]



FISH 037-18 (Mucosa)

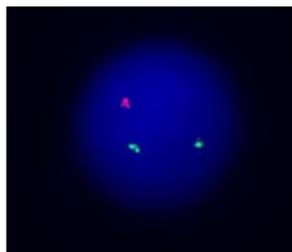
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[55]

Paciente 4



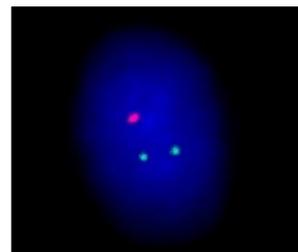
FISH 032-18 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 032-18 (SP)

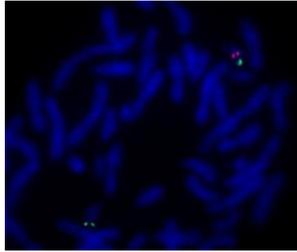
ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 055-18 (Mucosa)

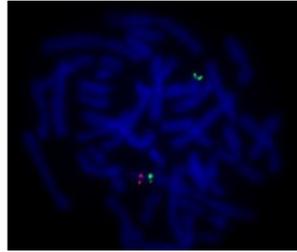
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[104]

Paciente 5



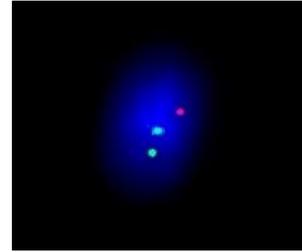
FISH 038-18 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5].nuc  
ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 038-18 (SP)

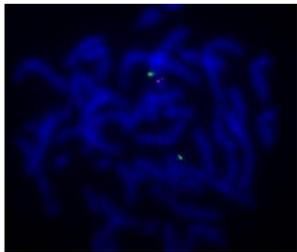
ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5].nuc  
ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 064-19 (Mucosa)

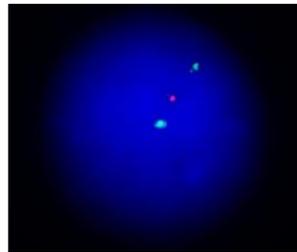
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[68]

Paciente 6



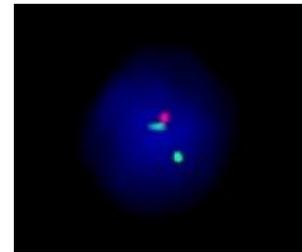
FISH 039-18 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5].nuc  
ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 039-18 (SP)

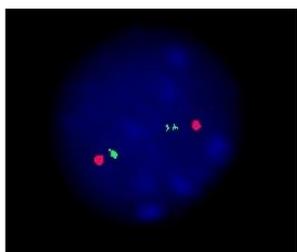
ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5].nuc  
ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 058-18 (Mucosa)

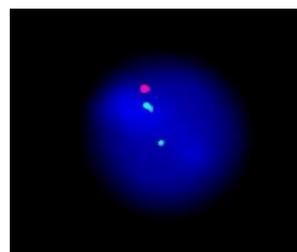
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]

Paciente 7



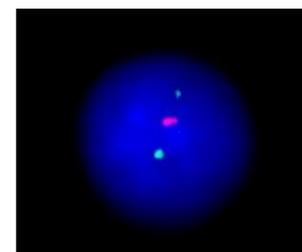
FISH 040-18 (SP)

nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X1)[16]/22q11.2(TUPLE1X2)[504]  
22q11.2(BCRX1)[224]



FISH 040-18 (SP)

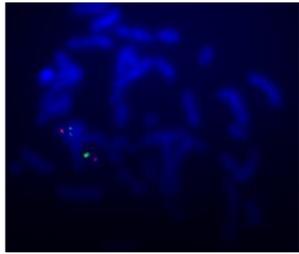
nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X1)[16]/22q11.2(TUPLE1X2)[504]  
22q11.2(BCRX1)[224]



FISH 040-18 BIS (Mucosa)

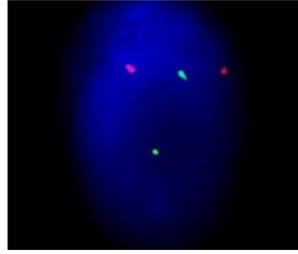
nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X1)[6]/22q11.2(TUPLE1X2)[44]

Paciente 8



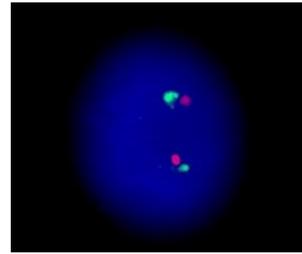
FISH 045-18 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[1].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[100]



FISH 045-18 (SP)

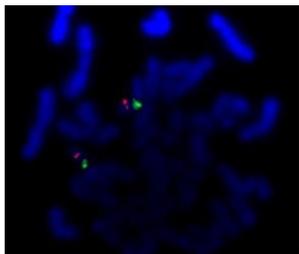
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[1].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[100]



FISH 043-18 (Mucosa)

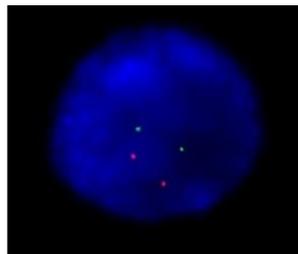
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]

Paciente 9



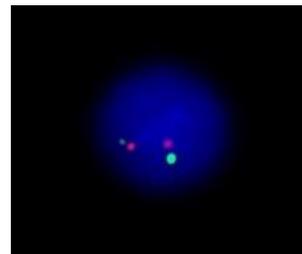
FISH 048-18 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc  
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]



FISH 048-18 (SP)

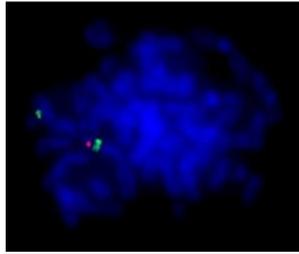
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc  
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]



FISH 079-18 (Mucosa)

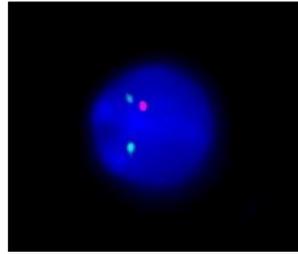
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[54]

Paciente 10



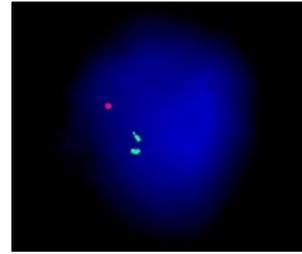
FISH 049-19 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[11].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]



FISH 049-19 (SP)

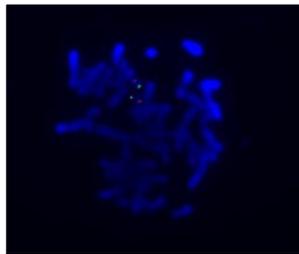
ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[11].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]



FISH 060-18 (Mucosa)

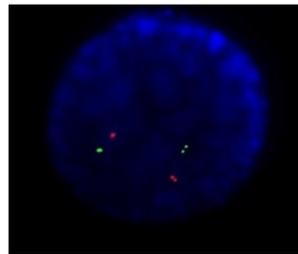
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[70]

Paciente 11



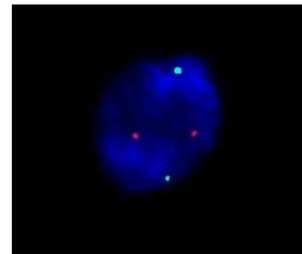
FISH 070-18 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[5].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[100]



FISH 070-18 (SP)

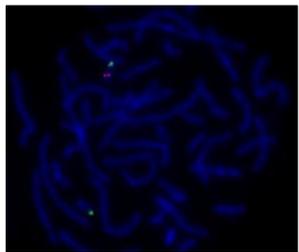
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[5].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[100]



FISH 067-18 (Mucosa)

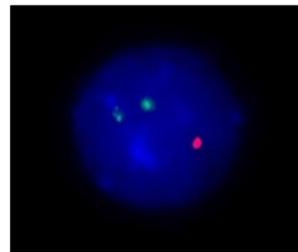
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[48]

Paciente 12



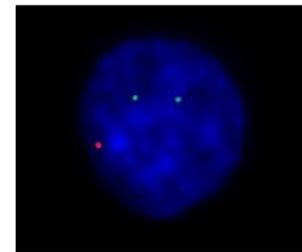
FISH 054-19 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 054-19 (SP)

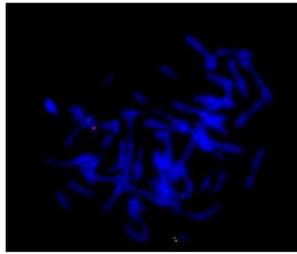
ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 068-18 (Mucosa)

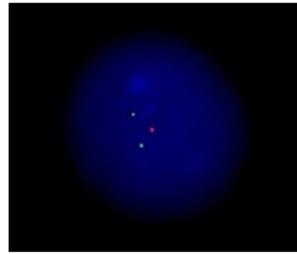
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]

Paciente 13



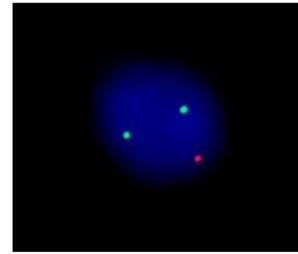
FISH 074-18 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[120]



FISH 074-18 (SP)

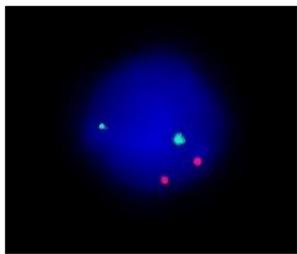
ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[120]



FISH 021-19 (Mucosa)

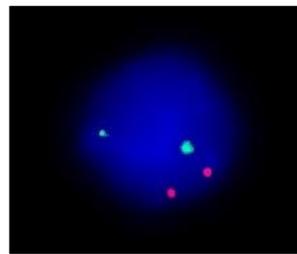
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]

Paciente 14



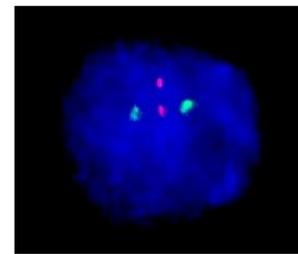
FISH 007-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[4].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 007-19 (SP)

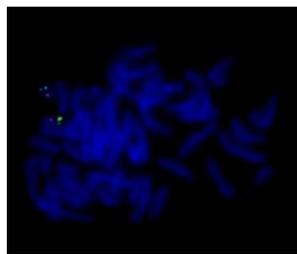
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[4].nuc ish  
22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 057-19 (Mucosa)

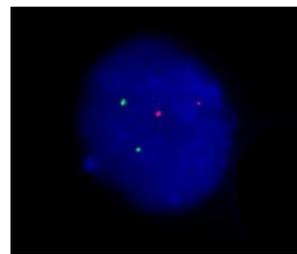
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[50]

Paciente 15



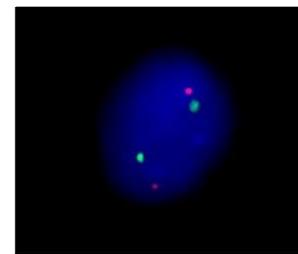
FISH 009-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 009-19 (SP)

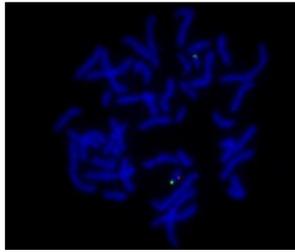
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 010-19 (Mucosa)

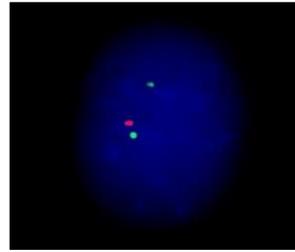
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[167]

Paciente 16



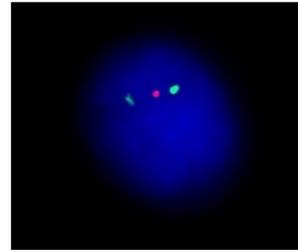
FISH 014-19 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[6].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 014-19 (SP)

ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[6].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]



FISH 032-19 (Mucosa)

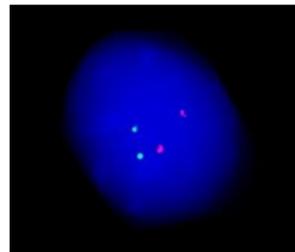
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[110]

Paciente 17



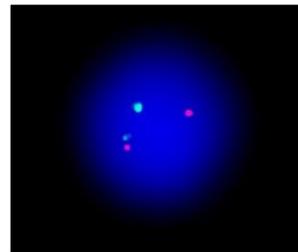
FISH 015-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[201]



FISH 015-19 (SP)

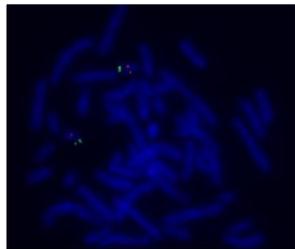
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[201]



FISH 033-19 (Mucosa)

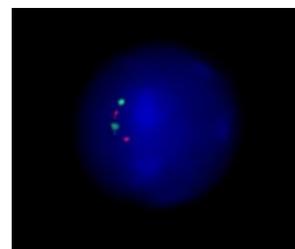
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]

Paciente 18



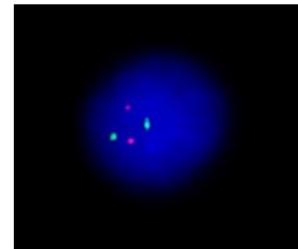
FISH 016-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 016-19 (SP)

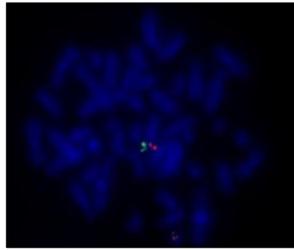
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 017-19 (Mucosa)

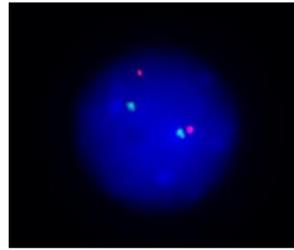
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[50]

Paciente 19



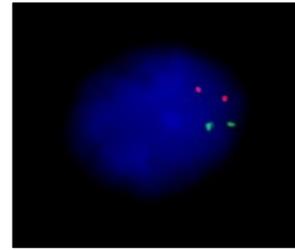
FISH 020-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 020-19 (SP)

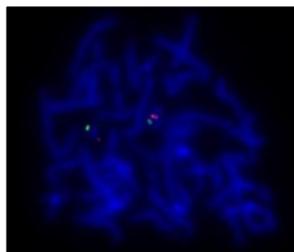
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]



FISH 019-19 (Mucosa)

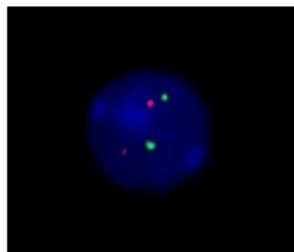
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[97]

Paciente 20



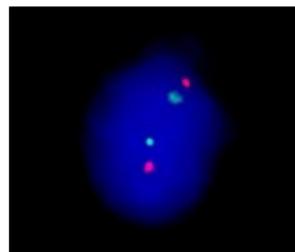
FISH 027-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[11].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[215]



FISH 027-19 (SP)

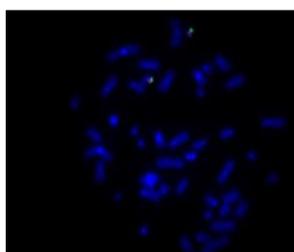
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[11].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[215]



FISH 028-19 (Mucosa)

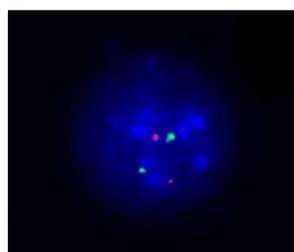
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[64]

Paciente 21



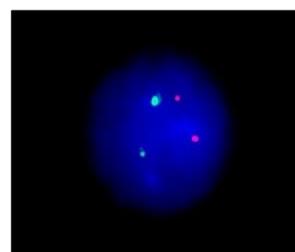
FISH 051-19 (SP)

ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[107]



FISH 051-19 (SP)

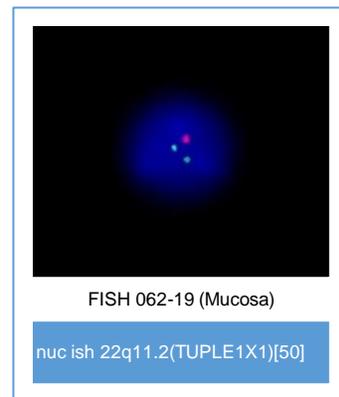
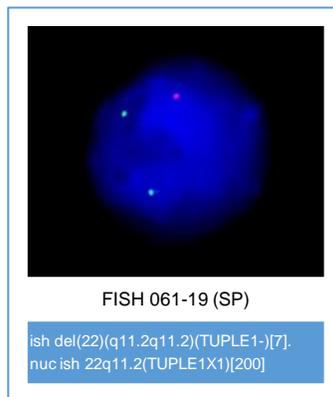
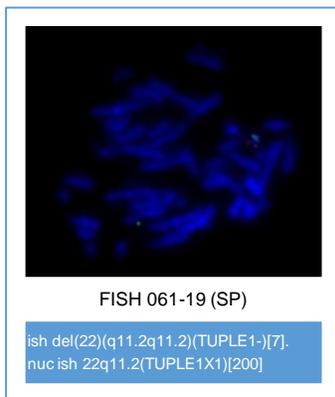
ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].  
nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[107]



FISH 050-19 (Mucosa)

nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[85]

Paciente 22



Paciente	Cariotipo	FISH en sangre periférica	FISH en mucosa oral
1	46,XY[15]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[11].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[50]
2	46,XX,16qh+[25]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[8].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]
3	46,XX[25]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[8].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[114]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[55]
4	46,XY[30]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[104]
5	mos 47,XXY[10]/46,XY[40]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[68]
6	46,XX[30]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]
7	46,XX,inv(9)(p13q13)	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[16]/22q11.2(TUPLE1X2)[504], 22q11.2(BCRX1)[224]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[6]/ 22q11.2(TUPLE1X2)[44]
8	46,XY[25]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[1].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]
9	46,XX[20]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[54]
10	46,XY,9qh-[25]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[11].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[100]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[70]
11	No cuenta con cariotipo	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[5].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[48]
12	46,XY[25]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]
13	46,XY[30]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[120]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]
14	No cuenta con cariotipo	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[4].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[50]
15	46,XY[30]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[167]
16	46,XX[13]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[6].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[110]
17	46,XY[30]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[201]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[100]
18	46,XYqh-[30]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[50]
19	Sin crecimiento	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[97]
20	46,XX,9qh-[30]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[11].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[215]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[64]
21	46,XY[15]	ish 22q11.2(TUPLE1X2)[10].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[107]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X2)[85]
22	46,XY[30]	ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[7].nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[200]	nuc ish 22q11.2(TUPLE1X1)[50]

## 9. DISCUSIÓN.

Como hemos visto el FISH ofrece numerosas posibilidades de estudiar el genoma completo o loci genómicos específicos. Las sondas pueden clasificarse de acuerdo a las secuencias de DNA detectadas. Esta clasificación incluye sondas de DNA de secuencia repetitiva (centromérica y telomérica), secuencia locus específica y sonda de pintado de cromosoma completo [15].

Las sondas locus específica pueden utilizarse para el diagnóstico de síndromes de microdelección y/o microduplicación, diagnóstico prenatal, análisis citogenético en cáncer y para confirmar variantes en el número de copias (CNV) [15]. La sonda utilizada para el diagnóstico de Síndrome de microdelección 22q11.2 es una sonda locus específica (TUPLE1).

La ventaja esencial de las técnicas citogenéticas moleculares de interfase, entre las cuales se encuentra el FISH, en contraste con la citogenética clásica es la capacidad de analizar regiones específicas en todos los tipos de tejidos [15]. En la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia en células de mucosa oral, se observan células en interfase, en las cuales fue posible visualizar la presencia o ausencia de la secuencia mediante sonda TUPLE1 [15].

El FISH en interfase permite la visualización de loci genómicos. El uso de sondas locus específica en esta técnica de citogenética molecular tiene ventajas y desventajas. La principal desventaja es que la eficiencia de hibridación de las sondas locus específica suele estar entre el 40-70% y tiene el potencial de producir falsos positivos o falsos negativos. Lo anterior en parte relacionado a la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula que puede producir un aumento o una disminución de señales relacionado a los procesos internos que se estén llevando a cabo. Además se requiere el uso de sondas de secuencia de DNA bien caracterizadas. Una ventaja de esta metodología es la capacidad de visualizar secuencias de DNA de menos de 1 Mb en núcleos en interfase [15].

Es un método rápido para la detección de microdeleciones, basados en reportes previos, como el realizado por Nieuwint et.al., en 3 pacientes que habían sido diagnosticados con Síndrome de Williams y 3 pacientes con síndrome de microdelección 22q11.2 con FISH en muestra de sangre periférica. Utilizaron FISH en frotis de mucosa oral utilizando sondas para 7q11.23 y 22q11.2. Además se realizó dicho estudio en 4 controles sanos. Detectaron el número correcto de señales con la sonda para síndrome de Williams en 94.9% y con la sonda 22q11.2 en 94.1%. En este estudio se mostró que el FISH en mucosa oral se puede realizar para la detección de síndromes de microdelección debido a que se obtuvieron resultados confiables [14].

En nuestra experiencia de los 22 pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de microdelección 22q11.2 en los cuales se realizó FISH en sangre periférica con sonda TUPLE1 resultaron 10 positivos a delección y 12 negativos a delección. Dicho estudio en células de mucosa oral utilizando la misma sonda se obtuvieron los

mismos resultados, mostrando también resultados confiables como el estudio realizado por Nieuwint et. al.

Además el uso de FISH en mucosa oral es una alternativa a la obtención de linfocitos en sangre periférica para la investigación de mosaicismo [8]. En el paciente 7 de nuestro estudio encontramos una deleción constitutiva del gen BCR y una deleción en mosaico por FISH con sonda TUPLE1 observándose sólo en un 3% (520 núcleos analizados), en células de sangre periférica. En células de mucosa oral corroboramos la deleción en mosaico, aunque en este tejido se observó en un 12% (50 núcleos analizados). Lo anterior nos mostró la utilidad del FISH en células de mucosa oral para la investigación de mosaicismo en diferentes tejidos.

En la revisión bibliográfica no encontramos estudios realizados en México, que muestren el uso de FISH en células de mucosa oral para el diagnóstico de Síndrome de microdeleción 22q11.2.

En nuestros resultados obtuvimos una concordancia perfecta entre ambas pruebas, si bien, el uso de FISH en mucosa oral nos resultó una prueba útil para el diagnóstico de Síndrome de microdeleción 22q11.2. En relación a lo anterior es importante mencionar, las ventajas y desventajas observadas en la elaboración de esta técnica. Una de las ventajas es el método de obtención (técnica no invasiva), solo es necesario un cepillado gentil de la mucosa oral mediante un citobrush, es un tejido accesible y además el resultado se puede obtener en 48 horas. Entre las desventajas observadas, se encuentra la contaminación con bacterias, estas pueden provocar artefactos o visualización de hibridación inespecífica. Es un tejido que requiere un pretratamiento específico (descrito en metodología), se debe realizar de manera adecuada para obtener una buena calidad en las laminillas.

De los 22 pacientes analizados, comentamos en el apartado de resultados, 12 fueron negativos a deleción y 10 positivos a deleción. En lo relacionado a los pacientes negativos a deleción, es importante mencionar que existen otras metodologías como el MLPA para el diagnóstico de deleciones atípicas, como se muestra en la figura 7.

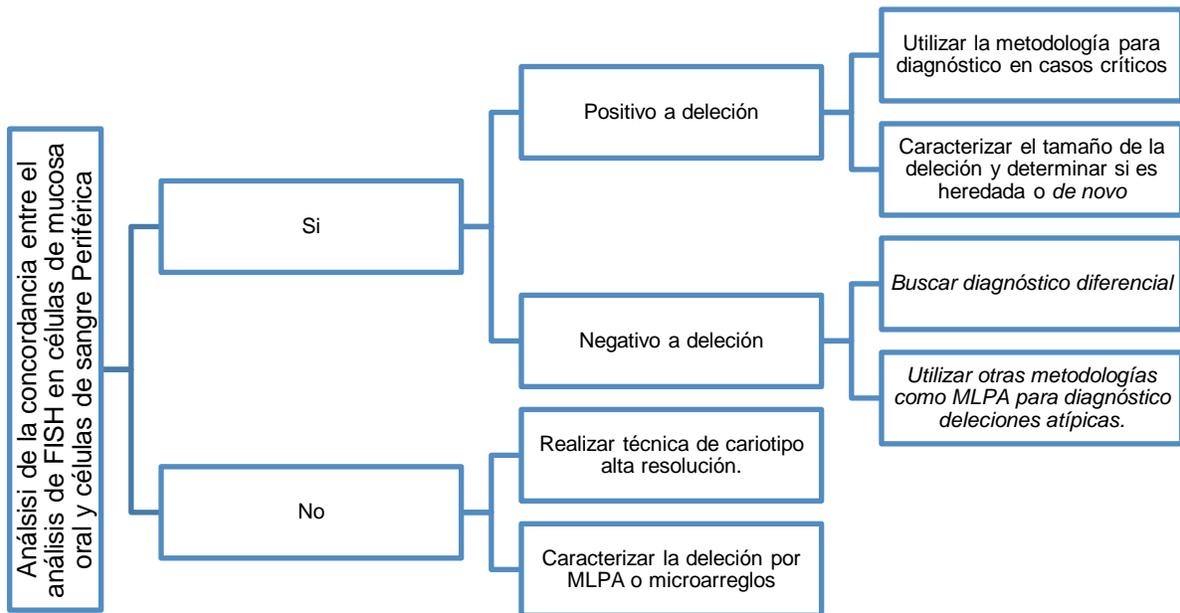


Figura 7.

## **10. CONCLUSIONES**

La técnica de citogenética molecular de hibridación *in situ* con fluorescencia en sangre periférica y en mucosa oral en el diagnóstico del síndrome de microdelección 22q11.2 tuvo una concordancia perfecta en nuestra muestra de pacientes analizados.

Sugerimos el uso de FISH en mucosa oral para el diagnóstico del Síndrome de microdelección 22q11.2 en pacientes en los cuales no es posible tomar una muestra de sangre debido a sus condiciones clínicas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Weise A, Mrasek K, Klein E, Microdeletion and Microduplication Syndromes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012; 60(5) 346–358
2. Wonkam A, Tokoy R, Cheloy D, Tekendo-Ngongang C, Kinguey S, Dahoun S. The 22q11.2 Deletion Syndrome in Congenital Heart Defects. *Global heart*. 2017.
3. Kobrynski L. J, Sullivan E. K. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet* 2007; 370: 1443–52.
4. Halder A, Jain M, Chaudhary I, Varma B. Chromosome 22q11.2 microdeletion in monozygotic twins with discordant phenotype and deletion size. *Molecular Cytogenetics*. 2012; 5:13
5. McDonald-McGinn D. M, Sullivan K. E, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman J. A, et al. 22q11.2 deletion síndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 1: 15071.
6. Cuneo B. F, 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face síndromes. *Current Opinion in Pediatrics* 2001; 13: 465–472
7. Beverly S. E. Molecular Mechanisms and Diagnosis of Chromosome 22Q11.2 Rearrangements. *Dev Disabil Res Rev*. 2008; 14(1): 11–18.
8. Koontz D, Baecher K, Kobrynski L, Nikolova S, Gallagher M. A Pyrosequencing-Based Assay for the Rapid Detection of the 22q11.2 Deletion in DNA from Buccal and Dried Blood Spot Samples. *J Mol Diagn*. 2014; 16: 533-540
9. Speicher M. R. Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) Techniques. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. 2005
10. Arsham M. S, Barch M. J, Lawce H. J. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 2017
11. Sukarova-Angelovska E, Piperkova K, Sredovska A, Ilieva G, Kocova M. Implementation of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) as a method for detecting microdeletion syndromes – our first experiences. *Contributions, Sec. Biol. Med. Sci*. 2007; 87–97
12. Romana S. P, Vekemans M, Clinical Molecular Cytogenetics. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. 2005
13. Paulo J, Ribeiro de Andrade J. G, Santos A. P, Gil-da-Silva-Lopes V. L, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra A. T. The use of FISH on buccal smear to investigate mosaicism with a 45,X cell line: study on healthy men and patients with disorders of sex development. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2014; 58/4

14. Nieuwint A.W, Van Hagen J.M, Heins M, et al. Rapid detection of microdeletions using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) on buccal smears. J Med Genet 2000;37

15. Vorsanova S.G, Yurov Y.B, Iourov Y.V. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. Molecular Cytogenetics 2010, 3:1

## 12. ANEXO 1

	<p><b>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLITICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD</b></p> <p><b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (Niños(as) con Síndrome de delección 22q11.2)</b></p>
Nombre del estudio:	<p><b>“Concordancia del FISH en mucosa oral y sangre periférica en el diagnóstico del Síndrome de delección 22q11.2 en pacientes del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional Siglo XXI</b></p>
Lugar y fecha:	<p>México, Ciudad de México, UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS</p>
Número de registro:	<p><b><u>R-2019-3603-027</u></b></p>
Justificación y objetivo del estudio:	<p style="text-align: center;">¿Por qué se realiza esta investigación?</p> <p>De forma normal, los seres humanos estamos constituidos por células que son los ladrillos que conforman nuestro cuerpo, cada una de las células contienen el material de la herencia empaquetado en 46 estuches llamados cromosomas, los cuales se organizan por pares del 1 al 22 más 2 cromosomas sexuales. En la región del cromosoma 22q11.2 se encuentran varios genes relacionados al desarrollo del corazón y de otros órganos.</p> <p>Mediante esta carta invitamos a participar en este estudio de investigación a su hijo(a) quien cursa con el diagnóstico clínico de síndrome de delección 22q11.2 para conocer si esa parte que integra la información de la herencia se encuentra presente de manera normal o en menor medida en comparación con otros niños(as).</p>
Procedimientos:	<p style="text-align: center;">¿Qué procedimiento se realizará?</p> <p>Los procedimientos que llevaremos a cabo en caso de que acepten participar en el estudio al firmar esta carta de consentimiento informado son:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Realizar unas preguntas de los datos personales como nombre, número de afiliación, edad, fecha y lugar de nacimiento, dirección y teléfono actuales.</li> <li>2.- Se tomará una muestra de sangre de 3 ml de alguno de los brazos del niño(a) (el volumen tomado equivale a una cucharadita) y se procederá a la realización de un estudio especial que se llama FISH, dicho estudio se realizará en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana de este Hospital de Pediatría, la sangre restante se desechará, la información genética sólo se utilizará para esta investigación y después del análisis se destruirá.</li> <li>3.- Se tomará una muestra de mucosa oral mediante un raspado gentil del interior de su boca con un citobrush.</li> </ol>
Posibles riesgos y molestias:	<p>Los 3 ml de la muestra tomada equivalen a menos del 1% del total de sangre que circula por el cuerpo de su hijo(a), por lo que el único riesgo al que podría estar expuesta es al piquete de la vena que se tendrá que realizar para obtener la muestra: dicho piquete es doloroso y puede ser molesto, en ocasiones podría quedar un moretón en el sitio de la punción, el cual es pasajero y no representa un riesgo mayor.</p>
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	<p>El diagnóstico de certeza en su hijo(a), así como brindar el asesoramiento genético correspondiente.</p>
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	<p>Los resultados obtenidos se informarán una vez concluido el proyecto de investigación y es importante aclarar que dichos resultados no modificarán el tratamiento o atención médica que recibirá su hijo(a) en el hospital dado que la atención y/o manejo necesarios se le seguirán otorgando conforme a los hallazgos clínicos con los que se cuente.</p>
Participación o retiro:	<p>La participación de su hijo(a) es completamente voluntaria. Usted puede decidir en cualquier momento retirar del presente estudio a su hijo(a) sin que esto afecte de ninguna manera la atención médica o quirúrgica dentro del Hospital de Pediatría y del IMSS.</p>
Privacidad y confidencialidad:	<p>Toda la información de su hijo(a) será guardada de forma confidencial y se identificará únicamente por medio de claves en nuestra base de datos. Las únicas personas autorizadas para acceder a la información, son el Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel, la Dra. Luz María Garduño Zarazúa y la Dra. Paloma del Carmen Salazar Villanueva.</p>

No autorizo que se tome la muestra.

Sí autorizo que se tome la muestra para este estudio.

Investigador Responsable: Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel (investigador responsable) Extensión 22643 o buscarle directamente en el consultorio 7 del Servicio de Genética Médica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI y la dirección es Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores. Delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México, CP 06720.

**Declaración de Consentimiento Informado:**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio. También, he leído (o me han leído) el contenido de este formato. Se me ha brindado la oportunidad de realizar preguntas y aclarar mis dudas acerca de mi participación y he entendido de forma clara a cada una de las respuestas que el personal encargado me ha otorgado. Al firmar este consentimiento, estoy de acuerdo en que mi hija participe en la investigación que aquí se describe.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de los padres, tutores o representantes legales

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

**Clave: 2810-009-013**

?

13. ANEXO 2

	<p><b>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLITICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD</b></p> <p><b>CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO (NIÑOS(AS) DE 8 AÑOS O MAYORES, CON SÍNDROME DE DELECIÓN 22q11.2)</b></p>
Nombre del estudio:	<p><b>“Concordancia del FISH en mucosa oral y sangre periférica en el diagnóstico del Síndrome de delección 22q11.2 en pacientes del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional Siglo XXI”</b></p>
Lugar y fecha:	<p>México, Ciudad de México, UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS</p>
Número de registro:	<p><b><u>R-2019-3603-027</u></b></p>
<p>Buenos días, mi nombre es Paloma del Carmen Salazar Villanueva y quiero invitarte a participar en un estudio de investigación que se está llevando a cabo en el Servicio de Genética de este hospital de pediatría. Como ya te ha platicado tu Doctor(a) y tus papás, todos tenemos una información genética en todas nuestras células. El objetivo de este estudio es conocer si una parte que integra tu información de la herencia se encuentra presente en menor cantidad medida en comparación con otros niños. Si aceptas participar en este estudio te tomaremos sangre de uno de tus brazos en una cantidad menor a la de una cucharadita mientras tu mamá o papá se encuentran a tu lado, el dolor será solo por un momento y será pasajero. Además, se te tomará una muestra del interior de tu boca con un pequeño cepillo que no te causará molestias.</p> <p>Tu participación no requiere que vengas al hospital mas veces adicionales a tus citas programadas. La información que tomemos del expediente sólo la podremos conocer mis tutores y yo, no la compartiremos con nadie más.</p> <p>Es importante que sepas que por tu participación no obtendrás algún beneficio o recompensa. Los resultados que vamos a obtener del análisis de tu sangre y de las células de tu boca posiblemente puedan ayudarnos a conocer más acerca del origen de tu enfermedad.</p> <p>Tu participación en este estudio es libre y voluntaria, si aceptas participar, toda la información será guardada de forma secreta y utilizada sólo para la investigación.</p>	
<p>Nombre del participante</p>	<p>Nombre y firma de quien obtiene el asentimiento</p>
<p>Testigo 1</p>	<p><b>Firma del encargado de obtener el asentimiento informado:</b> Le he explicado el estudio al participante y he contestado todas sus preguntas. De forma absolutamente voluntaria ha aceptado participar en este estudio</p>
<p>Parentesco con el participante</p>	
<p>Testigo 2</p>	
<p>Parentesco con el participante</p>	