



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la salud

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CIENCIAS MÉDICAS

**“Identificación de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en
pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE;**

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA;

Félix Julián Campos García

TUTORA;

Dra. Carolina Elizabeth Medina Escobedo
Centro Médico Nacional Yucatán “Ignacio García Tellez”, IMSS.

COTUTORES

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz
Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”

Dr. Héctor Armando Rubio Zapata
Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica, Facultad de
Medicina, UADY.

UNAM Entidad Académica Siglo XXI Campus Mérida

Mérida, Yucatán, México. Marzo, 2021



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la salud

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CIENCIAS MÉDICAS

**“Identificación de microdelecciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en
pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE;**

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA;


Félix Julián Campos García


TUTORA;

Dra. Carolina Elizabeth Medina Escobedo
Centro Médico Nacional Yucatán “Ignacio García Tellez”, IMSS.

COTUTORES

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz
Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”

Dr. Héctor Rubio Zapata
Facultad de Medicina, UADY.

UNAM Entidad Académica Siglo XXI Campus Mérida

Mérida, Yucatán, México. Marzo, 2021




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.

Agradecimientos

A Dios.

A Juan Pablo.

A mi familia; especialmente a Elián y Nina.

Dra. Addy M. Castillo Espíndola; por su amistad y su contribución invaluable a la realización de este trabajo.

Dr. Julio Lara; por su trabajo conjunto y desinteresado en el avance del conocimiento en Yucatán.

QFB. Mario Arturo Maldonado Solís [†], por su inspiración y apoyo. Se le extrañará siempre.

Tema Prioritario: Salud reproductiva, condiciones neonatales y anomalías congénitas.
Tema Específico: Sepsis y otras condiciones relacionadas con el nacimiento.
Nivel de Prevención: Prevención terciaria

ÍNDICE

Resumen estructurado.....	9
Marco teórico.....	10
Justificación.....	24
Planteamiento del problema.....	25
Pregunta de investigación.....	25
Hipótesis de investigación.....	25
Objetivos.....	26
Material y métodos.....	27
Elegibilidad de los sujetos.....	27
Variables de estudio.....	29
Medición de las variables.....	31
Consideraciones éticas.....	39
Aspectos de bioseguridad.....	42
Resultados.....	45
Discusión.....	53
Conclusiones.....	57
Referencias.....	58
Anexos.....	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Anomalías cardiovasculares asociadas a 22q11.2 _____	14
Tabla 2. Estudios de prevalencia e incidencia realizados a nivel mundial sobre la frecuencia de cardiopatías congénitas en el síndrome 22q11.2 _____	17
Tabla 3. Genes que se han identificado en la región 22q11.2 _____	19
Tabla 4. Características fenotípicas del síndrome 22q11.2 y su frecuencia. _____	20
Tabla 5. Estudios publicados sobre frecuencia de 22q11.2 con diferentes técnicas moleculares. _____	23
Tabla 6. Variables utilizadas y su descripción metodológica. _____	29
Tabla 7. Cantidades de reactivo para la PCR en tiempo real _____	36
Tabla 8. Condiciones para PCR punto final TBX1 _____	37
Tabla 9. Distribución por Sexo. _____	45
Tabla 10. Ciclos umbrales (C_T) de las muestras control y su predicción de los alelos, así como su interpretación. _____	48
Tabla 11. Cálculo de la dosis génica mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ la predicción es apoyada por el software CopyCaller. Se utilizó un umbral de 0.7 para la determinación de microdelección. _____	51
Tabla 12. Resumen de las características clínicas y demográficas de los pacientes con microdelección. _____	53
Tabla 13. Tasa de letalidad de cardiopatías congénitas troncoconales en la península de Yucatán. _____	54

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de (a) formación de los campos cardiogénos derivados del mesénquima esplácnico anterior. (b) Después de la fusión se aprecian el polo arterial (AP) y polo venoso (VP). _____	11
Figura 2. Esquema del tubo cardiaco al finalizar los movimientos de haza y previo a la cavitación, siguiendo el flujo sanguíneo de venoso a arterial: Seno venoso (SV), anillo sinoatrial (SAR), atrio primitivo (PA), anillo atrioventricular (AVR), ventrículo izquierdo primitivo (PLV), anillo ventrículoarterial (VAR), saco aórtico (AS). _____	11
Figura 3. Imagen esquemática de la región 22q11.2 donde se muestran las deleciones mas frecuentes. A – D: 86.3%. A – B: 7.3%. A – C: 1.7%. Atípicas: 3%. (15) _____	18
Figura 4. Esquema de la región 22q11.2 y los loci de los diferentes genes identificados en la región. (28) _____	18
Figura 5. Fascies de paciente con síndrome 22q11.2 (Fotografía tomada sin modificaciones de Kobrynski LJ, et al, 2007 con fines académicos) (29) _____	21
Figura 6. Estrategia general para obtención del perfil de dosis génica de TBX1 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal. _____	31
Figura 7. Esquema del locus 22q11.2 con los genes localizados en el locus proximal y distal. (39) _____	34
Figura 8. Esquema del principio del método TaqMan para la cuantificación de número de copias mediante qPCR. Para cada región se diseñan 3 sondas, 2 flanqueadoras (Primer F y Primer R) y una sonda unida a un desactivador del fluorescencia (Quencher) y un reportero (FAM o VIC). _____	35
Figura 9. La polimerasa comienza su trabajo de síntesis de la cadena complementaria durante la fase de Alineamiento / Extensión. _____	35
Figura 10. La polimerasa al encontrarse con la sonda reportera, la degrada, separándola del desactivador de fluorescencia. Al ser estimulado por luz del termociclador, emite una señal que es cuantificada por el equipo. _____	36
Figura 11. Proporción de cardiopatías congénitas conotruncuales en los sujetos reclutados de Enero – Diciembre 2020. _____	46
Figura 12. Diagrama que muestra el gen TBX1 y sus exones. En amarillo se señala la posición del cebador, ubicado en el exón 3. _____	46
Figura 13. Muestra la curva de amplificación (Fluorescencia VS Ciclo) del control positivo (monoalélico) y control negativo (bialélico), para el gen de referencia (RPPH1) y el gen de interés (TBX1). _____	47
Figura 14. Gráfica obtenida del software CopyCaller que contiene las predicciones de los dos pacientes positivos a deleción 22q11.2 (790 y 842) con los respectivos controles. _____	49
Figura 15. Gráfica de amplificación de qPCR de la muestra 790 (verde) y su control negativo (Amarillo). _____	49
Figura 16. Gráfica de amplificación de qPCR de la muestra 842 (verde) y su control negativo (Amarillo). _____	50
Figura 17. Gráfico que muestra los valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para los diferentes pacientes, así como su predicción. La línea roja marca el umbral de 0.7 para decisión de microdeleción. Los puntos verdes muestran los valores para los pacientes con predicción de deleción 22q11.2 _____	52

Índice de Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
aCGH	Hibridación genómica comparativa
C _T	Ciclo Umbral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FISH	Hibridación fluorescente in situ
LCR	Bajo Número de Copias
MLPA	Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura multiplex
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<i>RNAse P</i>	Componente H1 de la ribonucleasa P de RNA
RNV	Recién Nacidos Vivos
SDG	Semanas de Gestación
<i>TBX1</i>	factor de transcripción T box 1

Identificación de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR

Antecedentes: Los síndromes de microduplicación y microdelección del locus 22q11.2 son la causa más frecuente de cardiopatía congénita de origen genético en humanos, con una incidencia de 1:1800 a 1:4000 recién nacidos vivos (RNV), dentro del espectro se considera al síndrome de DiGeorge como el fenotipo severo y al síndrome velocardiofacial como el fenotipo leve y ambos presentan cardiopatía congénita conotruncal.

Objetivo General: Identificar microdeleciones o microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR.

Material y Métodos: Se realizó un estudio transversal, de tipo descriptivo, observacional, retrospectivo, ambilectivo, mediante el cual se estudió la microdelección o microduplicación del locus 22q11.2 en pacientes pediátricos atendidos en la UMAE Yucatán del IMSS con cardiopatía congénita conotruncal mediante la amplificación del gen *TBX1* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR), con el consentimiento firmado de su tutor. De 0.5 ml de muestra sanguínea mediante punción venosa periférica o capilar en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), posteriormente se realizó la extracción del DNA y se amplificó el locus 22q11.2 mediante la técnica de qPCR. Los oligonucleótidos usados fueron estandarizados mediante la tecnología TaqMan para el gen *TBX1* y un gen de referencia (RNAsa P), mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ se calculó la dosis génica estimada para cada muestra, tomando un umbral de <0.7 para microdelección heterocigota y 1.5 para microduplicación.

Resultados: Se analizó el DNA de 24 pacientes con diagnóstico de cardiopatía congénita conotruncal. La tetralogía de Fallot es el diagnóstico más frecuente (67%). Dos pacientes presentaron microdelección de la región 22q11.2 ($2^{-\Delta\Delta C_T} < 0.7$), los diagnósticos encontrados en ellos fueron transposición de los grandes vasos y atresia pulmonar, además de dismorfias características propias del síndrome 22q11.2.

Conclusiones: En esta muestra de pacientes con cardiopatía congénita conotruncal, la frecuencia de la microdelección 22q11.2 es del 8.33%, la cual es semejante a las frecuencias reportadas en otras regiones del mundo. La microdelección es más frecuentemente encontrada en cardiopatías conotruncuales consideradas graves. No se encontraron pacientes con microduplicación.

Marco teórico

Generalidades de las cardiopatías congénitas

Las cardiopatías congénitas se definen como los defectos en la embriogénesis del corazón y sus tractos de salida. La prevalencia de las cardiopatías congénitas en México se encuentra definida dentro del rubro del CIE 10 como “Enfermedades congénitas del sistema circulatorio” cuya prevalencia hasta el 2013 era de 2.0 casos por cada 10,000 RNV con una proporción de 1 muerte fetal por cada 6 recién nacidos vivos.(1) Con respecto a la incidencia de cardiopatías conotruncales, se reporta para tetralogía de Fallot $0.03 \times 10,000$ recién nacidos vivos (RNV). (2) Yucatán tiene una de las prevalencias de malformaciones congénitas más altas del país, reportando 102.8 defectos de nacimiento por cada 10,000 nacimientos.(1) Sin embargo, se desconoce la prevalencia y la etiología exacta de cardiopatías congénitas en Yucatán.

Se estima que del 3.3 al 16% de los pacientes con cardiopatías congénitas fallecen durante la infancia, y que más del 90% de los niños con cardiopatía congénita sobreviven hasta la edad adulta. (3) Al grado, que se calcula que existen 21 millones de personas viviendo con cardiopatía congénita en el mundo. (4)

Embriología normal del corazón

La formación del corazón embrionario comienza desde la etapa de blastocisto con la migración de células del epiblasto a través de la línea primitiva, las cuales conforman el mesodermo esplácnico anterior y migrarán de manera craneal hasta el campo cardiogénico. En la tercera semana de gestación (SDG) se fusionan los dos tubos de células mesenquimales por debajo del intestino medio, lo cual da lugar al infundíbulo arterial y venoso. (**Figura 1**)

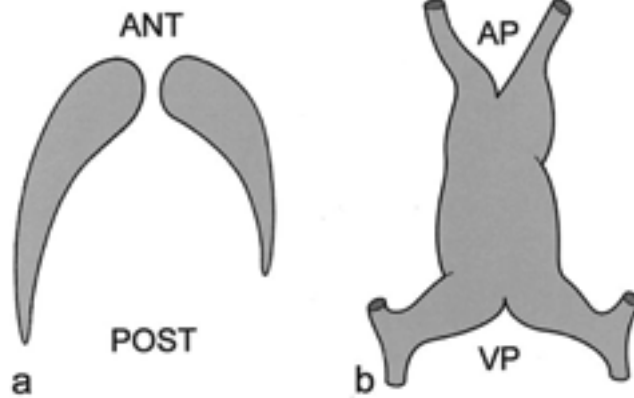


Figura 1. Representación esquemática de (a) formación de los campos cardiogenos derivados del mesénquima esplácnico anterior. (b) Después de la fusión se aprecian el polo arterial (AP) y polo venoso (VP).

El primer latido cardiaco se presenta al día 22 de gestación, en un estadio unitubular, el cual no asemeja aún la anatomía normal del corazón. Durante los días siguientes se presentan tres movimientos que definirán la estructura del corazón (**Figura 2**):

1. Movimiento inferoanterior del infundíbulo de salida (arterial)
2. Movimiento hacia la izquierda de los ventrículos.
3. Movimiento cefaloposterior de las aurículas.

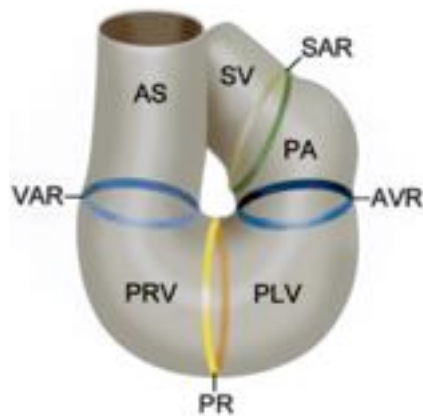


Figura 2. Esquema del tubo cardiaco al finalizar los movimientos de haz y previo a la cavitación, siguiendo el flujo sanguíneo de venoso a arterial: Seno venoso (SV), anillo sinoatrial (SAR), atrio primitivo (PA), anillo atrioventricular (AVR), ventrículo izquierdo primitivo (PLV), anillo ventriculoarterial (VAR), saco aórtico (AS).

Formación de las cavidades cardiacas

La formación de los septos cardiacos se divide en tres estructuras; los atrios, los ventrículos y el tracto de salida. Los atrios reciben irrigación de la vena cava inferior, el seno coronario y la vena pulmonar, que en un principio todas desembocan del lado del ventrículo derecho. Las válvulas de los senos venosos forman el *septum spurium*, el cual degenera posteriormente. A la par, se forma el *septum primum*, que es una primera división entre atrio izquierdo y atrio derecho. El *septum primum* y el cojinete endocárdico forman el *foramen primum*, el cual es un cortocircuito fisiológico de derecha a izquierda en el corazón embrionario. Al fusionarse el *septum primum* con el cojinete endocárdico, desaparece el *foramen primum*, pero el cortocircuito se mantiene debido a que se formó otra comunicación en el septo por apoptosis, el *foramen secundum*. Justo a un lado, en el atrio derecho se forma el *septum secundum*, el cual tiene en su estructura el foramen oval. La sangre embrionaria debe pasar del atrio derecho a través del foramen oval y el foramen secundum hacía el atrio izquierdo. (5)

La formación de los ventrículos está determinada por el crecimiento de un ápice muscular desde la punta ventricular hacia arriba, dividiendo en anillo atrioventricular en dos; la válvula mitral y tricúspide.

En la división del tracto de salida arterial, el tronco arterioso debe dividirse en aorta y arteria pulmonar, además de quedar orientadas, cada una en sus respectivos ventrículos. Esta separación está dirigida por células de la cresta neural de los arcos faríngeos, las cuales liberan TGF- β 2 y orientan al tracto de salida ventricular. Un gen que participa de esta parte de la diferenciación cardiaca es *TBX1*, el cual se encuentra dentro de la región 22q11.2 y al tener una baja expresión provoca cardiopatías conotruncuales. (5, 6)

Productos de los arcos branquiales

El aparato faríngeo, es un sistema específico de vertebrados que desarrolla una serie de prominencias en la cara lateral de la cabeza del embrión, estas estructuras están conformadas por arcos, hendiduras y sacos faríngeos. Todas las capas embrionarias contribuyen en el aparato faríngeo: ectodermo, mesodermo, endodermo y cresta neural. Los 4 arcos faríngeos tienen productos esqueléticos y óseos principalmente, de los cuales destacan los músculos de la masticación y los huesos del oído interno (I arco); músculos de la expresión facial y huesos del cuello (II arco). Los principales productos de los sacos faríngeos son el timo (III saco) y las glándulas paratiroides (III y IV sacos). (7)

El síndrome 22q11.2 reúne malformaciones cardiovasculares con defectos de los arcos faríngeos. Se desconoce la razón exacta del por qué existe esta relación, pero la alteración de la dosis génica (delección o duplicación) del gen *TBX1* en ratones produce cardiopatías conotruncuales (tronco arterioso persistente). (8, 9)

Tipos de cardiopatías congénitas: conotruncuales

Las cardiopatías congénitas conotruncuales se originan de defectos en la separación del *bulbus cordis* o tronco arterioso, originando malformaciones como tetralogía de Fallot (10 – 15%), transposición de los grandes vasos sin ventrículo único (5-7%), tronco arterioso (30 – 50%), atresia pulmonar (30 – 45%), doble tracto de salida del ventrículo derecho (<1.5%), arco aórtico interrumpido tipo B (50 – 80%). (10)

Las cardiopatías congénitas conotruncuales están relacionadas con el síndrome 22q11.2 y están ligadas a su mortalidad (11, 12). Aproximadamente, el 25% de las cardiopatías congénitas en la consulta de cardiopediatría son conotruncuales y se desconoce el genotipo de los pacientes. En la Tabla 1 se enumeran las cardiopatías congénitas relacionadas y su frecuencia con 22q11.2. (13)

Tabla 1. Anomalías cardiovasculares asociadas a 22q11.2

Anomalías cardiovasculares asociadas a 22q11.2			
Nombre del Defecto	Características	Defectos asociados	Frecuencia
Tetralogía de Fallot.	<ul style="list-style-type: none"> - Defecto de septo ventricular. - Cabalgamiento de la aorta. - Estenosis pulmonar. - Hipertrofia de ventrículo derecho. 	<ul style="list-style-type: none"> - Hipoplasia / ausencia del septum infundibular. - Ausencia de válvula pulmonar. - Atresia / hipoplasia de arterias pulmonares. - Arterias pulmonares cruzadas. - Arco aórtico derecho/cervical con/sin arteria subclavia izquierda aberrante. - Arteria subclavia derecha aberrante. 	10 – 15%
Transposición de los grandes vasos sin ventrículo único.	<ul style="list-style-type: none"> - La aorta se origina del ventrículo derecho. - La arteria pulmonar se origina del ventrículo izquierdo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Defecto de septo ventricular. - Anormalidades coronarias. - Obstrucción del tracto de salida izquierdo. - Persistencia del conducto arterioso. 	5 – 7%
Tronco arterioso.	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de separación de la aorta y arteria pulmonar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Displasia severa de válvulas truncales. - Atresia de arterias pulmonares. - Arterias pulmonares cruzadas. - Doble arco aórtico. - Arco aórtico derecho/cervical con/sin arteria subclavia izquierda aberrante. - Arco aórtico interrumpido tipo B. 	30 – 50%
Doble tracto de salida del ventrículo derecho.	<ul style="list-style-type: none"> - Aorta y arteria pulmonar emergen del ventrículo derecho. 	<ul style="list-style-type: none"> - Defecto de septo ventricular. 	<1.5%
Atresia pulmonar + defecto septal ventricular	<ul style="list-style-type: none"> - Fusión de la válvula pulmonar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colaterales aorta-pulmonares mayores. - Atresia / Hipoplasia de arterias pulmonares. 	30 – 45%

	<ul style="list-style-type: none"> - Defecto de septo ventricular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ductus arteriosus ausente. - Arco aórtico derecho/cervical con/sin arteria subclavia izquierda aberrante. - Arteria subclavia derecha aberrante. 	
Arco aórtico interrumpido tipo B	<ul style="list-style-type: none"> - Separación del arco aórtico entre la arteria carótida y subclavia izquierda. 	<ul style="list-style-type: none"> - Defecto de septo ventricular subarterial con hipoplasia del septo infundibular. - Arteria subclavia derecha aberrante. - Tronco arterioso. - Arterias pulmonares cruzadas. 	50 – 80%
Defecto de septo ventricular	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de fusión del septo ventricular. - Comunicación entre ventrículo derecho e izquierdo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Arco aórtico cervical - Arco aórtico derecho/cervical con/sin arteria subclavia izquierda aberrante. - Arteria subclavia derecha aberrante. 	5%

Genética de las cardiopatías congénitas

Existen múltiples síndromes genéticos que se asocian a cardiopatías congénitas y su abordaje es todo un reto diagnóstico, al igual que su asesoramiento genético. Enumerar todas y cada una de las causas genéticas de cardiopatías congénitas esta fuera del propósito de este marco teórico, pero existen más de 4,400 enfermedades genéticas ligadas a defectos cardiovasculares congénitos, según la base de datos OMIM.(14)

El abordaje de las cardiopatías congénitas se divide en sindrómicas, las cuales están asociadas a otros defectos morfogénicos y no sindrómicas, las cuales son malformaciones aisladas. Es importante remarcar que la delección o duplicación de la región 22q11.2 y la variación de la dosis génica de *TBX1* son de las causas de cardiopatía congénita más frecuente en humanos, después del síndrome de Down. (15)

Factores epigenéticos en el desarrollo embriológico del corazón

Estudios recientes han demostrado que en el desarrollo del corazón también influye la epigenética, específicamente la regulación de la remodelación de la cromatina dependiente de ATP, modificación covalente de histonas y metilación de DNA. Un ejemplo muy importante es el Síndrome CHARGE que presenta anomalías cardiovasculares como tetralogía de Fallot, es causado por la haploinsuficiencia de *CHD7*, una helicasa de DNA. (16)

Las cardiopatías conotruncuales en el síndrome 22q11.2 y su impacto a nivel mundial.

El espectro 22q11.2 se debe a la deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 22, región 1, banda 1, sub-banda 2. Dicha región cuenta con >3 Mega bases y se han identificado 62 genes. Se puede resaltar al gen *TBX1* el cual codifica para la proteína T-box 1 que está descrito como un factor de transcripción expresado exclusivamente en las bolsas faríngeas. Su función principal es la polarización celular y su insuficiencia completa en modelos murinos genera un cuadro fenotípico idéntico al síndrome de DiGeorge. Además, funciona como factor de transcripción de genes que se expresan en el desarrollo. (15)

El espectro 22q11.2 se presenta como casos de *novo* en un 75 – 94%, siendo muy pocos casos los que presentan herencia.

Se desconoce la prevalencia exacta del síndrome 22q11.2 en México, sin embargo, existen referencias que lo consideran el síndrome genómico más frecuente, llegando a tener incidencias de 1:3,000 a 1:6,000 RNV (17) y se cuenta como la segunda causa de cardiopatía congénita (CC) de origen genético después del Síndrome de Down. A nivel mundial existen múltiples estudios que demuestran que la prevalencia puede llegar hasta el 25% de los pacientes con cardiopatías congénitas conotruncuales (18). También hay estudios más conservadores y minuciosos como el realizado en Francia (19) el cual

demonstró una incidencia poblacional de 5.6 – 14:100,000 RNV. En la Tabla 2 se muestran los estudios demográficos mundiales encontrados en la bibliografía.

Tabla 2: Estudios de prevalencia e incidencia realizados a nivel mundial sobre la frecuencia de cardiopatías congénitas en el síndrome 22q11.2

País (Centro Diagnóstico)	Frecuencia de 22q11.2 en pacientes con cardiopatía troncoconal.	Referencia
Brazil	25%	Nogueira SI, et al. 2009 (18)
EUA	10% (en tetralogía de Fallot)	Lammer EJ, et al. 2009 (20)
EUA	35.3% (prenatal)	Belluco FT, et al. 2010 (21)
Polonia	20%	Wozniak A, et al. 2010 (22)
Dinamarca	1.9%	Agergaard P, et al. 2011 (23)
India	6%	Anilkumar A, et al. 2011 (24)
China	6.13%	Xu YJ, et al. 2011 (25)
EUA	5%	Baker K, et al. 2012 (26)
EUA	13%	Peyvandi S, et al. 2013 (27)
Francia (Nacional)	5.6 – 14:100,000 RNV	Poirsier C, et al. 2016 (19)

La región 22q11.2

La región 22q11.2 está involucrada en rearrreglos cromosómicos que alteran la dosis génica, resultando en desórdenes genómicos que se caracterizan por discapacidad intelectual y/o malformaciones congénitas. Son tres los fenotipos que se han identificado por este desorden genómico: Síndrome Cat-Eye, Síndrome der(22) y síndrome velocardiofacial/DiGeorge, dependiendo de las regiones involucradas puede haber un fenotipo clásico o un solapamiento entre las características clínicas de ellos.

La deleción de entre 0.7 y 3 MB se produce por el mecanismo de recombinación homóloga no alélica entre secuencias palindrómicas ricas en AT dentro de la región 22q11.2, que son repetidos en bajo número de copias (LCR). (15). Estas LCR están en 4 grupos dentro de la región y están relacionadas con los puntos de “corte” más frecuentes en 22q11.2.

La deleción más frecuente se da entre las regiones LCR22A y LCR22D (86%), los rearrreglos menos frecuentes son LCR22A y LCR22B (5%), LCR22B y LCR22D (4%), LCR22A y LCR22C (2%), LCR22C y LCR22D (1%). (15)

En la región 22q11.2 se han identificado hasta la fecha 62 genes, de los cuales 45 codifican para proteínas, 7 genes para miRNA y 10 genes no codificantes (**Figura 3**). El gen que más se ha estudiado en la región es *TBX1*, el cual codifica para un factor de transcripción T-box y cuya alteración en la dosis génica provoca cardiopatías congénitas. (9) En la Tabla 3 se muestran los genes más importantes y su función.

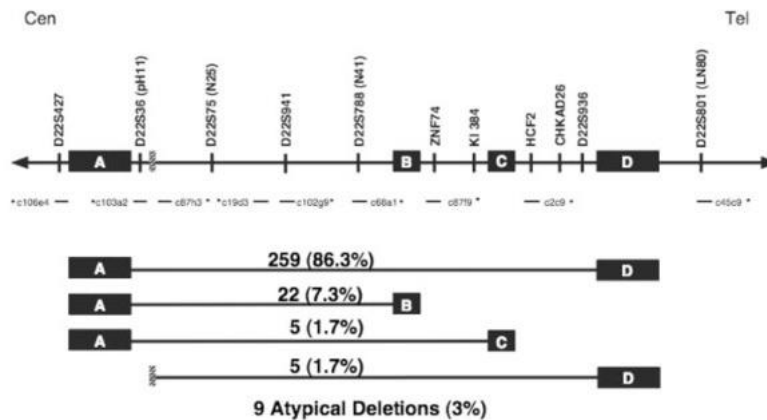


Figura 3. Imagen esquemática de la región 22q11.2 donde se muestran las deleciones mas frecuentes. A – D: 86.3%. A – B: 7.3%. A – C: 1.7%. Atípicas: 3%. (15)

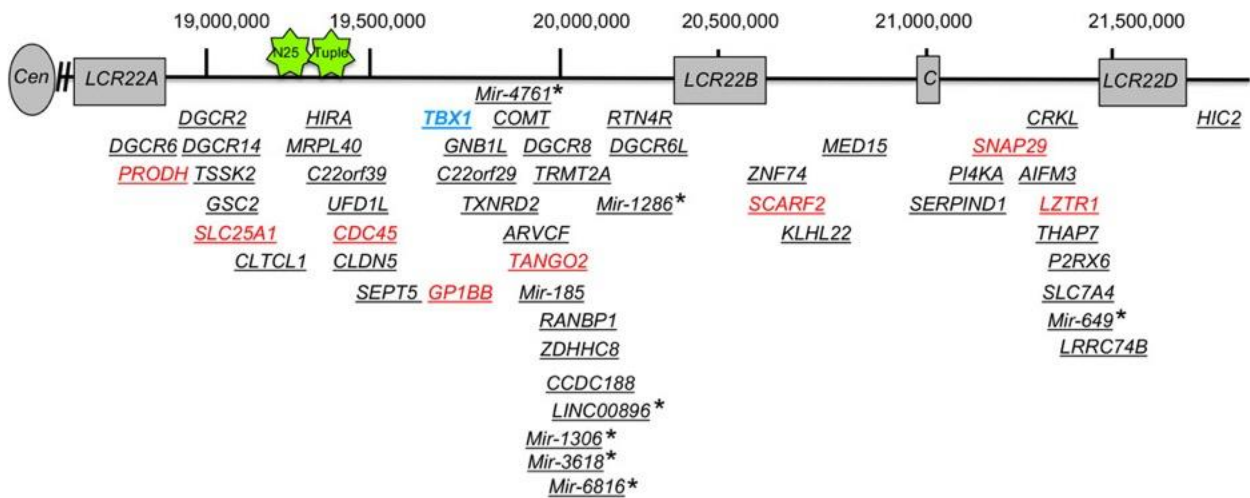


Figura 4. Esquema de la región 22q11.2 y los loci de los diferentes genes identificados en la región. (28)

Tabla 3. Genes que se han identificado en la región 22q11.2

Gen	Producto	Función
<i>DGCR6</i>	-laminina 1-like	Proteína de adhesión
<i>PRODH</i>	Prolina deshidrogenasa	Enzima involucrada en el catabolismo de la prolina
<i>DGCR2</i>	Proteína integral de la membrana; Lectina tipo-C	Receptor de adhesión
<i>TSK</i>	Cinasa de Treonina/Lisina	Trasducción de señales
<i>DGSI</i>	Proteína tipo Goosecoid	Factor de transcripción
<i>SLC25A1</i>	Proteína transportadora de citratos	Catalizadora del transporte de citratos a través de la membrana mitocondrial
<i>CLTCL1</i>	Proteína tipo clatrina de cadena pesada	Transportador intracelular mediado por vesículas.
<i>HIRA</i>	Proteína con dominios WD40	Regulador de la transcripción
<i>NLVCF</i>	Proteína nuclear	Desconocido
<i>UFD1L</i>	Proteína de degradación de ubiquitina tipo 1	Degradación proteica ubiquitina dependiente
<i>CDC45L</i>	Proteína de inicio del ciclo celular	Inicio de la replicación del DNA
<i>CLDN5</i>	Claudina 5	Componente de uniones intercelulares
<i>PNUTL1</i>	Proteína tipo septina	Interviene en la citocinesis
<i>GP1BB</i>	Glucoproteína plaquetaria subunidad	Componente de proteínas transmembranales
<i>TBX1</i>	T-box 1	Factor de transcripción
<i>GNB1L</i>	Proteína G subunidad	Componente de las transducción de señales de las proteínas G
<i>TR</i>	Reductasa de Tiorredoxina	Regulación de la reducción proteica de tiorredoxina
<i>COMT</i>	Metiltransferasa de Catecol-O	Metabolismo de catecolaminas
<i>ARVCF</i>	Proteína tipo catenina	Uniones adherentes intercelulares
<i>T10</i>	Proteína rica en Serina/Treonina	Desconocido

<i>RANBP1</i>	Proteína de unión a RAN 1	Transporte interceular
<i>ZNF74</i>	Proteína con 12 dominios de dedos de zinc	Regulador de la transcripción
<i>CRKL</i>	Proteína adaptador con dominios SH2/SH3/SH3	Uniones proteicas
<i>LZTR1</i>	Proteína de unión a DNA	Factor de transcripción

Fenotipo

El síndrome 22q11.2 se considera un espectro, el cual abarca fenotipos leves (síndrome velocardiofacial) a genotipos severos (Síndrome de DiGeorge). A pesar de que entre los pacientes con síndrome 22q11.2 haya el mismo tamaño de microdeleción, los pacientes pueden mostrar cualquiera de los fenotipos. No hay criterios diagnósticos para el síndrome 22q11.2, sin embargo, los datos fenotípicos más frecuentes encontrados en los pacientes incluyen (Tabla 4): inmunodeficiencia (deficiencia de linfocitos T), cardiopatía congénita, paladar blando hendido, hipocalcemia, malformaciones renales, disfagia y retraso en el desarrollo psicomotor. (13)

Tabla 4. Características fenotípicas del síndrome 22q11.2 y su frecuencia. (13, 29)

Característica	Frecuencia
Retraso en el desarrollo psicomotor	>90%
Cardiopatía Congénita	76%
Anomalías velofaríngeas y de vía aérea superior (Paladar blando hendido, insuficiencia velopalatina, red laríngea, anillo vascular)	76%
Inmunodeficiencia (disfunción de células T, inmunoglobulinas y defectos de inmunidad humoral)	77%
Hipocalcemia	49%
Malformaciones Renales	36%
Anomalías gastrointestinales (Disfagia, malrotación intestinal, enfermedad de Hirschprung, ano imperforado)	35%
Polihidramnios	16%
Polidactilia	4%

Característica	Frecuencia
Hernia Diafragmática	1%
Trombocitopenia	<1%
Hiperrespuesta pulmonar	<1%
Inestabilidad vasomotora	<1%
Anomalías craneovertebrales y cervicales (fusión de cervicales, C1 hipoplásica)	<1%

La fascies del paciente con síndrome 22q11.2 (**Figura 5**) son características, con hipoplasia medio facial, ptosis, hipertelorismo, fisuras palpebrales con el canto externo dirigido hacia arriba, dismorfias de pabellones auriculares, raíz de la nariz prominente, punta de la nariz bulbosa, narinas hipoplásicas, nariz bífida, boca pequeña, cara asimétrica al llanto.



Figura 5. Fascies de paciente con síndrome 22q11.2 (Fotografía tomada sin modificaciones de Kobrynski LJ, et al, 2007 con fines académicos) (29)

El síndrome velocardiofacial y DiGeorge comparten las mismas características a excepción de que en el Síndrome de DiGeorge los pacientes presentan disgenesia de timo y paratiroides, lo que conlleva a inmunodeficiencia en la infancia e hipocalcemia.

Existe una alta prevalencia del síndrome 22q11.2 en pacientes con cardiopatías congénitas conotruncuales: tetralogía de Fallot, atresia pulmonar con comunicación

interventricular, tronco arterioso, arco aórtico interrumpido y defectos del septo ventricular. Estos defectos conotruncales están frecuentemente relacionados con otras anomalías cardiovasculares, como anomalías del arco aórtico, arterias pulmonares, septum infundibular y válvulas semilunares, lo que complica el tratamiento quirúrgico. (30)

La microduplicación de la región 22q11.2 también está implicada en la etiología de cardiopatía congénita, principalmente tetralogía de Fallot (59%), síndrome de corazón izquierdo hipoplásico (12%) y cardiopatías complejas (2%). Sin embargo, el síndrome de microduplicación 22q11.2 se considera un síndrome emergente y poco estudiado. (9)

Métodos de detección de las variantes del número de copias

qPCR: La Reacción en Cadena en Tiempo Real (qPCR) es una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose la tecnología en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y quenchers. Ambos factores, permiten monitorizar en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación y va a sustituir a los pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR tradicional.(31) La qPCR se útil para realizar la detección de variantes del número de copias de manera rápida y en un mayor número de muestras. La sensibilidad depende de la región estudiada, para *TBX1* la sensibilidad es del 72% comparada con MLPA. (32)

FISH: La hibridación fluorescente *in situ* permite detectar secuencias de ácidos nucleicos de manera morfológica en cromosomas cultivados. Esto se logra mediante el marcaje fluorescente de sondas específicas para regiones del DNA genómico. La técnica de FISH permite identificar variantes de número de copias de hasta 3 mega pares de bases de tamaño, por lo que tiene una mejor resolución que el cariotipo, pero tiene la desventaja de que se emplea para una región específica del genoma. (19) En los estudios de citogenética molecular, permanece como el estándar de oro en el análisis del locus

22q11.2 con la sonda TUPLE1, por lo que los análisis de sensibilidad se basan en esta técnica como confirmación definitiva. (22, 31)

MLPA: La amplificación de la sonda dependiente de la ligadura multiplex, es una variante de PCR que permite detectar reordenamientos crípticos. Consiste en la detección simultánea de varias regiones genómicas que presentan distinto número de copias (dosis), esto se logra mediante el diseño de primers de distinto tamaño, que contienen la secuencia de interés y una secuencia comodín que dan productos de distinto tamaño, lo cual permite diferenciarlos al momento de la electroforesis. La sensibilidad en el diagnóstico de pacientes con 22q11.2 es del 95 - 99% (33, 34) Sin embargo, la técnica no es rápida y su uso en grandes cantidades de muestras es poco factible.

Array-CGH: La hibridación genómica comparativa, también conocido como “cariotipo molecular” no requiere de cultivo previo y se utiliza para detectar diferencias en el número de copias cromosómicas entre dos genomas y por lo tanto localizar regiones de desproporción genómica ya sea duplicaciones o deleciones. La resolución es mucho más alta que el cariotipo convencional y el FISH, dependiendo del número de sondas utilizadas se pueden ver pérdidas o ganancias de hasta 250 kb. (19) Existen publicaciones que proponen esta técnica como el nuevo estándar de oro en el diagnóstico de 22q11.2 debido a su profundidad y que la técnica es capaz de diferenciar el tamaño de las deleciones existentes en 22q11.2. (35, 36) Sin embargo, es debatible debido a los costos y que Array-CGH no identifica rearrreglos cromosómicos como las técnicas de citogenética convencional.

Tabla 5. Estudios publicados sobre frecuencia de 22q11.2 con diferentes técnicas moleculares.

Características de la Población	Método	Frecuencia de 22q11.2	Referencia
Cardiopatía Congénita	FISH	14.94%	Wozniak A, et al. 2010 (22)
	qPCR	5.49%	Tomita A, et al. 2010 (31)
	PCR-RFLP, MLPA, FISH	1.27%	Huber J, et al. (37)
	aCGH	4.94%	Choi BG, et al. 2018 (36)
Hipocalcemia, labio/paladar hendido	MLPA	1.77%	Sivertsen A, et al. 2007 (34)

Justificación

Las cardiopatías congénitas ocupan el tercer lugar en incidencia de defectos congénitos al nacimiento (2.0 por cada 10,000 RNV), después de criptorquidia y polidactilia (2); sin embargo, ocupan el primer lugar de defectos congénitos de nacimiento con pobre pronóstico, específicamente aquellos pacientes con tetralogía de Fallot, un tipo de cardiopatía conotruncal relacionada con la microdelección de 22q11.2

A nivel mundial se estima que el síndrome 22q11.2 es el síndrome genómico más frecuente, la causa más frecuente de cardiopatía congénita de origen genético después del síndrome de Down (29) y la segunda causa más frecuente de paladar blando hendido. (8) En México se desconoce la etiología de las cardiopatías congénitas, estudiar la microdelección o microduplicación del locus 22q11.2 permitiría conocer su frecuencia en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal. El diagnóstico específico del síndrome permitirá a los pacientes confirmar la etiología, contar con un diagnóstico y pronóstico precisos, así como participar en la propuesta y planeación de políticas institucionales que permitan el bienestar de futuros pacientes. Coadyuvará a la toma de decisiones sobre acciones terapéuticas específicas (cirugía cardiovascular), asesoramiento genético enfocado a la prevención, contribuir a la generación de criterios diagnósticos específicos y generar estrategias de salud enfocadas mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La Unidad Médica cuenta con la infraestructura y personal capacitado para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con cardiopatías congénita; los pacientes reciben atención en la unidad de cuidados intensivos neonatales, el servicio de cardiología pediátrica, cirugía cardiovascular y genética médica que colaboran en conjunto y facilitarán el apoyo necesario para la realización del presente protocolo.

Planteamiento del problema

El presente estudio tiene como propósito identificar la microdelección o microduplicación de una secuencias del gen *TBX1* del locus 22q11.2 en el fenotipo de pacientes con cardiopatía congénita conotruncal, toda vez que el espectro 22q11.2 es el síndrome genómico más común en humanos con una prevalencia de 1:1800 a 1:4000 recién nacidos vivos (RNV) (29) y se cuenta como la segunda causa de cardiopatía congénita (CC) de origen genético después del Síndrome de Down. Dentro del espectro se considera al síndrome de DiGeorge como el fenotipo más severo y al síndrome velocardiofacial como el fenotipo más leve. Ambos se originan de la deleción proximal del cromosoma 22 (22q11.2). Este síndrome genómico es el más común en la naturaleza y una de las causas de cardiopatías congénitas más severas, presenta el mayor índice de mortalidad y morbilidad.(12) En nuestra población se desconoce la prevalencia que existe de la microdelección o microduplicación del gen *TBX1* en el locus 22q11.2 y su expresión en el fenotipo de pacientes con cardiopatía conotruncal, por lo que se propone la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta de investigación:

¿Cuáles son los patrones de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR?

Hipótesis de Investigación

Toda vez que se trata de un estudio transversal descriptivo (en una sola población con cardiopatía congénita conotruncal) no se presenta hipótesis.

El estudio transversal descriptivo tiene como fin estimar la magnitud y distribución de una enfermedad o condición de salud en un momento dado, además de medir otras características en los individuos de la población. Son estudios que sirven para levantar información y generar hipótesis de investigación.

Objetivos:

Objetivo general: Identificar microdeleciones o microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR.

Objetivos particulares:

1. Determinar la prevalencia de microdeleciones del locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal.
2. Determinar la prevalencia de microduplicaciones del locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal.
3. Describir el fenotipo de los pacientes con microdelección o microduplicación en la región 22q11.2.
4. Describir los hallazgos de la dosis génica de la región 22q11.2 y el fenotipo.

Material y Métodos

Diseño: Estudio transversal

Tipo de estudio: Transversal, descriptivo, observacional, ambilectivo.

Universo: Pacientes con cardiopatía congénita

Población: Pacientes derechohabientes con cardiopatía congénita conotruncal atendidos en la Unidad Médica de Alta Especialidad en Mérida.

Selección de la muestra: Muestreo no probabilístico consecutivo.

Elegibilidad de los sujetos

Tamaño de la muestra:

Se desconoce la prevalencia de pacientes con microdelección o microduplicación 22q11.2, que se atiende en la UMAE Mérida, por lo que es deseable considerar para el estudio a todos los pacientes atendidos en la División de pediatría de la Unidad en un período de 10 años. Sin embargo, toda vez que se describe que las cardiopatías congénitas conotruncales están relacionadas con el síndrome 22q11.2 (11, 12) y que aproximadamente el 25% de los pacientes con cardiopatías congénita conotruncal en la consulta de cardiopediatría pueden tener microdelección o microduplicación de 22q11.2 (18), ante el conocimiento de que existen reportados 75 casos en la unidad y tomando como base para la determinación del tamaño de la muestra dicho universo se tiene que: Si la población es finita, es decir conocemos el total de la población y se desea saber cuántos del total de sujetos se estudiarán, utilizamos la fórmula de cálculo de tamaño de muestra de proporciones (38):

$$n = \frac{Np(1 - p)}{(N - 1)D + p(1 - p)}$$

Donde:

- N = Total de la población
- p= 0.05 (grado de confianza del 95%)
- D = 0.0016 (precisión)

El cálculo estima la inclusión de 21 participantes.

Criterios de selección de la muestra:

- Criterios de inclusión:
 - Edad: recién nacidos hasta 15 años de edad.
 - Sexo: masculino/femenino.
 - Asentimiento firmado (según el caso).
 - Carta de consentimiento informado firmado por el tutor.
- Criterios de no inclusión:
 - Pacientes con diagnóstico confirmado de otro síndrome genético. (ejemplo: síndrome de Down).
 - Madre con diabetes gestacional, fenilcetonuria o exposición al ácido retinoico.
- Criterios de eliminación:
 - Degradación del DNA genómico y término de la muestra original sin poder obtener una nueva.

Definición de la unidad de análisis

Paciente de sexo indistinto, recién nacido a 15 años de edad con diagnóstico confirmado por cardiopediatría de cardiopatía congénita conotruncal: Tetralogía de Fallot., transposición de los grandes vasos, tronco arterioso, doble tracto de salida del ventrículo derecho, atresia pulmonar, arco aórtico interrumpido tipo B.

Método de localización de los pacientes:

Los pacientes serán localizados mediante la base de datos de la unidad de Cardiopediatría de la Unidad Médica de Alta Especialidad en Mérida, la cual contiene datos de contacto y citas próximas. La base de datos será manejada con confidencialidad y en apego a las normas institucionales.

Variables de estudio:

Tabla 6. Variables utilizadas y su descripción metodológica.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Escala de Medición	Unidad de Medición.
Microdelección	Es un segmento de DNA igual o mayor a 1 kb cuyo el cual está suprimido comparándolo con el genoma de referencia.	Las microdelecciones se estudian por distintos métodos, dependiendo de su resolución. Se realizará PCR en tiempo real mediante la tecnología TaqMan, basado en tres cebadores por segmento a analizar: tres para un gen de referencia (<i>RPPH1</i>) y tres para un gen de estudio (<i>TBX1</i>). Los cebadores están compuestos por las secuencias sentido y antisentido de la región de interés, además de una tercera sonda que tiene unida en el extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' un desactivador de fluorescencia. Esta tercera sonda solo libera fluorescencia cuando es degradada por la actividad de exonucleasa 3'-5' de la polimerasa. El cambio de fluorescencia es cuantificado por el instrumento y calcula el CT (ciclo umbral), que es el ciclo en el cual comienza la replicación logarítmica de la PCR. El cálculo de número de copias se hace mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ que se basa en el CT del gen de referencia y el gen de interés, si el resultado es menor a 0.7 se considera microdelección.	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Presente Ausente
Microduplicación	Es un segmento de DNA igual o mayor a 1 kb cuyo el cual está duplicado comparándolo con el genoma de referencia.	Las microduplicaciones se estudian por distintos métodos, dependiendo de su resolución. Se realizará PCR en tiempo real mediante la tecnología TaqMan, basado en tres cebadores por segmento a analizar: tres para un gen de referencia (<i>RPPH1</i>) y tres para un gen de estudio (<i>TBX1</i>). Los cebadores están compuestos por las secuencias sentido y antisentido de la región de interés, además de una tercera sonda que tiene unida en el extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' un desactivador de fluorescencia. Esta tercera sonda solo libera fluorescencia cuando es degradada por la actividad de exonucleasa 3'-5' de la polimerasa. El cambio de fluorescencia es cuantificado por el instrumento y calcula el CT (ciclo umbral), que es el ciclo en el cual comienza la replicación logarítmica de la PCR. El cálculo de número de copias se hace mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ que se basa en el CT del gen de referencia y el gen de interés, si el	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Presente Ausente

		resultado es mayor a 1.5 se considera microduplicación.			
Cardiopatía Congénita Conotruncal	Defectos en la embriogénesis del corazón y sus tractos de salida, específicamente del cono arterioso.	Las cardiopatías congénitas conotruncal se originan por defectos en la división embriológica del cono arterioso, dando como resultado una gama de 6 fenotipos diferentes dependiendo de la gravedad. Cada una de ellas es diagnosticada mediante revisión clínica por cardiopediatría y ecocardiograma. El diagnóstico será obtenido mediante la revisión del expediente clínico del paciente.	Cualitativa	Nominal policotómica	Tetralogía de Fallot. Transposición de los grandes vasos. Tronco arterioso. Doble tracto de salida del ventrículo derecho. Atresia pulmonar. Arco aórtico interrumpido tipo B.

Técnica de recolección de la muestra

Previa aprobación del comité correspondiente se realizó un estudio de tipo transversal, descriptivo, observacional, ambilectivo, que incluyó pacientes con diagnóstico de cardiopatía congénita conotruncal, atendidos en la Unidad cuyos padres aceptaron firmar la carta de consentimiento informado y asentimiento en su caso (Anexo 1). Las variables de interés se registraron en la hoja de recolección de datos elaborada para fines del presente estudio (Anexo 2).

El alumno de maestría acudió a la consulta de cardiopediatría (consultorio 3 de la consulta externa de la UMAE Yucatán) se evaluó a los pacientes y se incluyeron a aquellos que cumplieron los criterios de inclusión, una vez que la médica tratante terminó la consulta, previa amplia explicación del protocolo y en caso de haber aceptado se procedió a la firma de consentimiento informado del padre o tutor, se realizaron preguntas de variables sociodemográficas de carácter informativo.

El alumno de maestría acudió de manera regular al gabinete (ecocardiograma) de cardiopediatría, para búsqueda de sujetos potencialmente elegibles, se contactó al padre o tutor, se informó de los riesgos y posibles beneficios y en caso de aceptar se otorgó formato de consentimiento informado para firma.

Medición de las variables

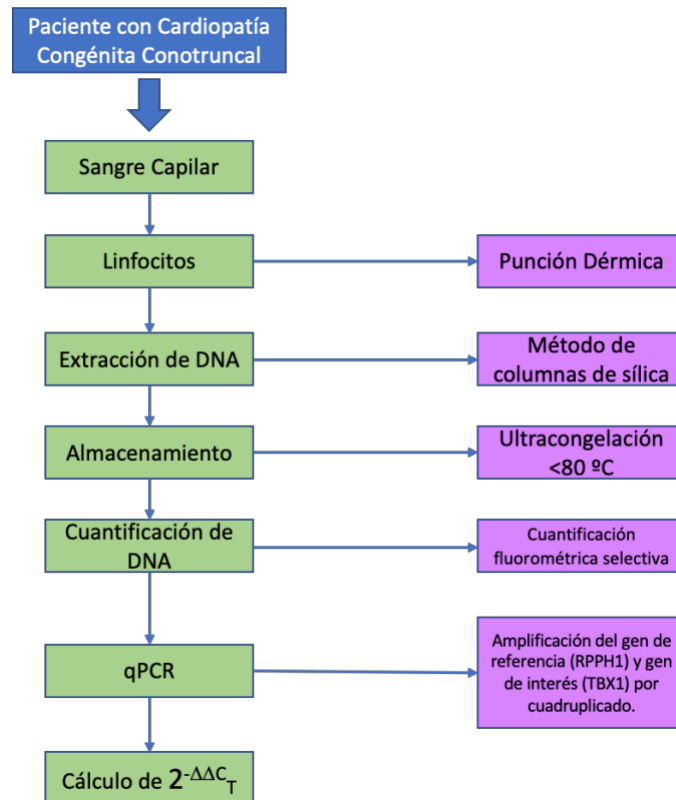


Figura 6. Estrategia general para obtención del perfil de dosis génica de TBX1 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal.

1. Procedimiento de llenado de hoja de recolección de datos

Se explicó a los padres por parte de alumno de maestría que la información recabada es confidencial y fué resguardada por los autores sólo con fines del presente protocolo. Se procedió a la captura de los datos referenciados en el anexo 2.

2. Procedimiento de cuantificación de dosis génica de *TBX1* mediante qPCR

La metodología de extracción de DNA y estandarización de los cebadores para TBX1 se realizó de manera conjunta en el laboratorio de genética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” y el laboratorio de genética y biología molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Se procedió a explicar a los padres el procedimiento de la toma de muestra, así como sus posibles riesgos, y se procederá a la toma de muestra biológica. (**Figura 6**)

Toma de muestra biológica.

Se obtuvo, por parte de Dr. Félix Julián Campos García, 0.5ml de muestra sanguínea mediante punción venosa periférica o capilar en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), marca *Vacutainer* con tapón morado, mediante técnica limpia utilizando guantes estériles y limpieza del área a puncionar con alcohol etílico al 95%.

Método de extracción del DNA

Se utilizó el kit Pure Link® Genomic DNA de la empresa ThermoFisher®. Fueron colocados 200 µl de sangre fresca en un tubo Eppendorf esteril, posteriormente se agregó 20µl de proteinasa K y 20 µl de RNasa A, se da vortex y se incuba a temperatura ambiente por 2 min, se agregan 200µl de Pure Link Genomic Lysis y se mezcla bien por vortex. Incubar a 55°C por 10 minutos. Se frena la reacción agregando 200µl de etanol de 96-100%, se mezcla bien por vortex por 5 segundos. Se traspasa el producto a una columna Pure Link, se centrifuga a 10,000 rpm por 1 minuto. Se descarta el desecho y se agregan 500 µl buffer de lavado 1, se centrifuga a 10,000 rpm por 1 minuto. Se descarta el desecho y se agregan 500 µl buffer de lavado 2, se centrifuga a velocidad máxima por 3 minutos. Se coloca la columna en un tubo estéril de 1.5 µl debidamente etiquetado con el nombre de la persona. Se diluye el DNA con 75 µl de Pure Link Genomic Elution Buffer, se incuba a temperatura ambiente por 1 minuto, se centrifuga la columna a máxima velocidad por 1 minuto.

Método de transporte de muestras de DNA genómico

El DNA genómico obtenido por parte del alumno de maestría fue debidamente etiquetado y congelado a -70 °C en un ultracongelador para su almacenamiento y conservación.

Una vez recolectadas las muestras suficientes para el protocolo fueron enviadas al laboratorio. Las muestras congeladas fueron colocadas en una hielera con congelantes que resguardaron la temperatura entre 0–5°C.

Cuantificación del DNA

La cuantificación de DNA se realizó mediante cuantificación fluorométrica con el equipo Qubit® el cual está basado en la cuantificación de fluorescencia objetivo-específico, ya que el pigmento utilizado se une de manera selectiva al DNA y no a otras moléculas con volúmenes mínimos de 1µl. Se realizaron diluciones a cada una de las muestras para contar con 2 ng/µl en un volumen mínimo total de 16 µl.

Selección de los genes a amplificar

Se seleccionó *TBX1* el cual está presente en el locus 22q11.2 (**Figura 7**), lo cual permitió identificar variaciones en el número de copias de distinto tamaño de manera cualitativa. Con base a la estandarización como ensayo de referencia para estudios de variables de número de copias, se seleccionó el gen de referencia *RPPH1* que codifica al componente H1 de la ribonucleasa P de RNA (HGNC: 19273).

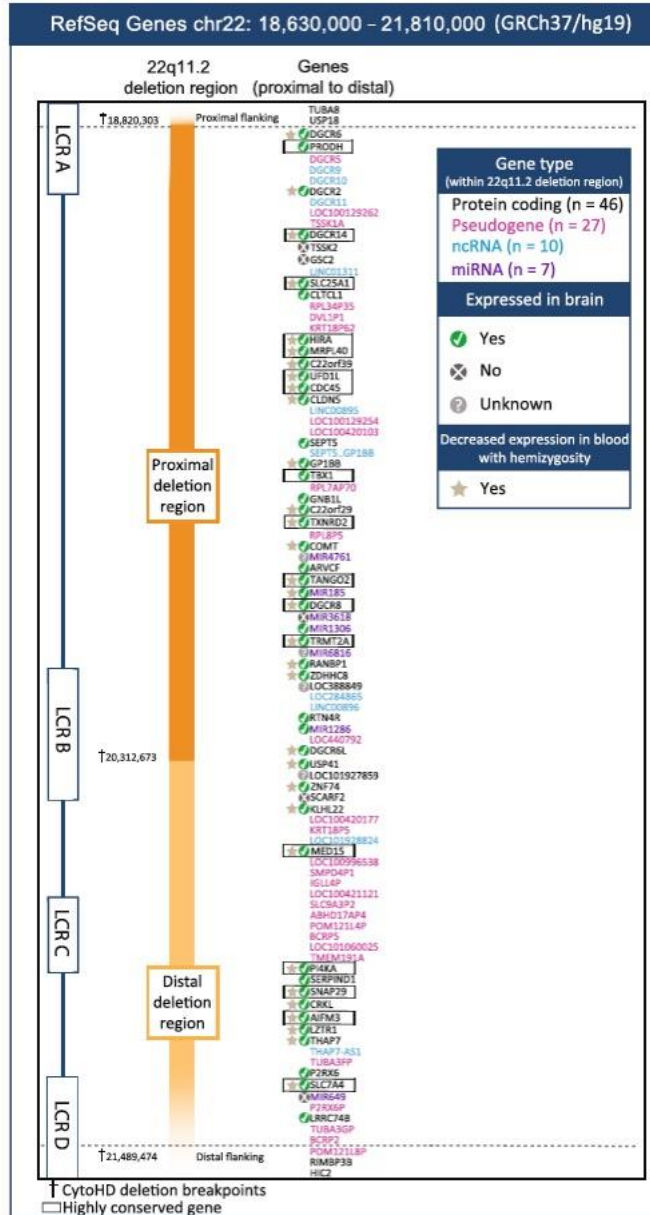


Figura 7. Esquema del locus 22q11.2 con los genes localizados en el locus proximal y distal. (39)

Cuantificación de la dosis génica mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Se cuantificó la dosis de un gen de referencia (*RPPH1*) y un gen de estudio (*TBX1*) que es un gen que codifica para el factor de transcripción T box 1 ubicado en el locus 22q11.2, basados en el método TaqMan.

Principio del Método TaqMan

Los cebadores están basados en la tecnología TaqMan® (**Figura 8, Figura 9, Figura 10**), compuestos por las secuencias sentido (forward) y antisentido (reverse) de la región de interés, además de una tercera sonda que tiene unida en el extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' a un desactivador de fluorescencia (quencher). Esta tercera sonda solo libera fluorescencia cuando es degradada por la actividad de exonucleasa 3'-5' de la polimerasa, por lo que solo se produce fluorescencia en caso de haber amplificación alelo específica.

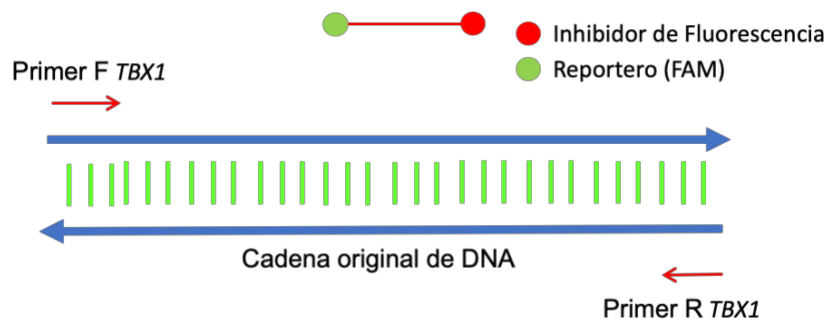


Figura 8. Esquema del principio del método TaqMan para la cuantificación de número de copias mediante qPCR. Para cada región se diseñan 3 sondas, 2 flanqueadoras (Primer F y Primer R) y una sonda unida a un desactivador del fluorescencia (Quencher) y un reportero (FAM o VIC).

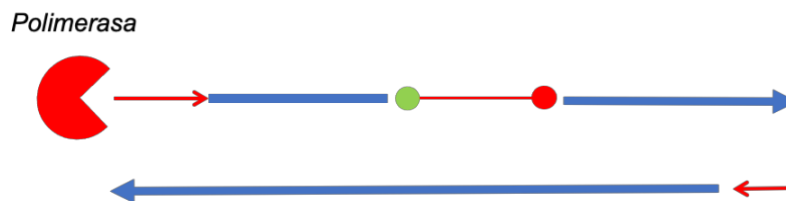


Figura 9. La polimerasa comienza su trabajo de síntesis de la cadena complementaria durante la fase de Alineamiento / Extensión.

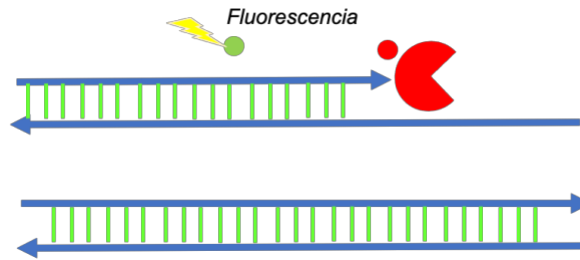


Figura 10. La polimerasa al encontrarse con la sonda reportera, la degrada, separándola del desactivador de fluorescencia. Al ser estimulado por luz del termociclador, emite una señal que es cuantificada por el equipo.

El cambio de fluorescencia a través de los ciclos es cuantificado por el instrumento y grafica la fluorescencia VS ciclos, que representa la acumulación del producto en el transcurso de la reacción en cadena de la polimerasa. Además, el equipo calcula el CT (cycle threshold) que es el ciclo en el cual comienza la replicación logarítmica de la PCR.

Es posible combinar en la misma reacción los cebadores del gen de referencia (*RPPH1*), y los cebadores del gen de interés (*TBX1*) marcados con dos diferentes fluoróforos (VIC y FAM). El termociclador mide la fluorescencia de ambos genes a lo largo de los ciclos y mediante el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$ al calcular el número de copias presentes en la reacción.

En la Tabla 7 y Tabla 8 se muestran las cantidades utilizadas de cada reactivo por reacción. Cada una de las reacciones fue realizada por cuadruplicado, lo cual está conforme al control de calidad del procedimiento.

Tabla 7. Cantidades de reactivo para la PCR en tiempo real

Reactivo	Cantidad (μl)
MasterMix TaqMan ProAmp	5.00
Primer de Referencia (RNase P)	0.5
Primer de <i>TBX1</i>	0.5
DNA genómico	4.00
Volumen Final	10.00

Tabla 8. Condiciones para PCR punto final TBX1

Fase	Temperatura	Tiempo
Activación Enzimática	50 °C	2:00
Desnaturalización Inicial	95 °C	10:00
40 Ciclos		
Desnaturalización Ciclo	95 °C	0:15
Alineamiento / Extensión	60 °C	1:00

Fases de la PCR en tiempo real

1. Activación enzimática: Se usa temperatura de 50 °C para estabilización enzimática y de los reactivos a una temperatura homogénea en todos los tubos de reacción.
2. Desnaturalización: Temperatura en la que se separa la doble cadena de DNA para permitir la hibridación de los cebadores en el siguiente paso.
3. Alineamiento: A la temperatura de 60 °C se alinean los cebadores con la secuencia templado del DNA genómico. Esta temperatura se basa en la temperatura de disociación (T_m) de los cebadores, basados en la cantidad de guaninas y citosinas presentes en su secuencia. En el presente protocolo se utiliza la temperatura sugerida por en el inserto.
4. Extensión: temperatura a la que actúa la DNA polimerasa de manera óptima, sintetizando una cadena de oligonucleótidos a partir del cebador colocado en la secuencia de interés. Es en este paso que el equipo cuantifica la cantidad de fluorescencia generada en el tubo de reacción, y el ciclo en el cual se hubica el inicio de la amplificación logarítmica de la reacción se señala como C_T .

Se utilizó el termociclador StepOne® de Applied Biosystems®, programado en modo “Quantification” variedad “ ΔC_T ”. Los resultados fueron exportados al software CopyCaller® de ThermoFisher® para su interpretación.

Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para cuantificación relativa

Para el cálculo de predicción del número de copias mediante qPCR se utilizó el software CopyCaller® de ThermoFisher®, el cual utiliza el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ el cual se basa en que a

partir del producto de la división del ciclo umbral (C_T) del gen de referencia y el C_T del gen de interés, obtenidas de la misma reacción y por cuadruplicado para asegurar que las variaciones observadas se deban a la variabilidad en el número de copias y no a la cantidad de DNA en la reacción.

El gen de referencia fue *RPPH1* que codifica al componente H1 de la ribonucleasa P de RNA (HGNC:19273) y el gen de interés es *TBX1* que codifica para el factor de transcripción T box 1 son amplificados en un ensayo calibrador (control sano), el equipo calcula el ciclo en el cual inicia la duplicación logarítmica del DNA para ambos genes (C_T) se hace un promedio de las 4 reacciones y la diferencia entre el C_T del gen del interés y el C_T del gen de referencia resulta en el ΔC_T de la reacción control, la cual debe ser cercana a 0 (ambos genes bialélicos amplifican de manera similar)

$$\Delta C_T \text{ control} = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen referencia}$$

$\Delta\Delta C_T$

Posteriormente se procede al cálculo del $\Delta\Delta C_T$, el cual es la diferencia entre el ΔC_T de la reacción control y la ΔC_T de la reacción de interés (paciente).

$$\Delta\Delta C_T \text{ paciente} = \Delta C_T \text{ paciente} - \Delta C_T \text{ control}$$

Una vez obtenido el valor de $\Delta\Delta C_T$ del paciente se realiza la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para normalizar el resultado, el cual nos explica cuántas copias gen de interés existen en la muestra, siendo valores menores a 0.7 referentes a delección (monoalélico) y mayores a 1.5 refieren microduplicación (bialélico).

Para el proceso de validación se utilizó un paciente sano (Adulto sin cardiopatía congénita) y un paciente con diagnóstico clínico y molecular de microdelección de 22q11.2, dicha muestra fue proporcionada por el laboratorio Biogen en la Ciudad de México, en donde se realizó FISH utilizando la zona TUPLE1.

Cada corrida consistió en al menos un paciente con cardiopatía congénita conotruncal, control positivo (síndrome 22q11.2), control negativo (sano). Muestras procesadas por cuadruplicado. Además, se incluyó un pozo de reacción negativo para templado, sin DNA, que en su lugar se colocaban 4 µl de agua libre de nucleasas.

Las muestras marcadas con desviación estándar grande fueron reprocesadas para control de calidad.

Análisis estadístico

La información se concentró en una hoja de cálculo de Excel 2016 (Microsoft ©, Redmont, Washington) para conformar una base de datos. Se realizó la interpretación y análisis subsecuente de la información recabada a través de estadística descriptiva, la cual incluyó la presentación de los datos demográficos con medidas de tendencia central, las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias (número absoluto y porcentaje), las variables cuantitativas se presentaron con la media \pm desviación estándar. Los resultados se presentan en tablas y gráficas adecuadas al tipo de variables. Los cálculos y las gráficas se realizaron con el programa R Studio con las librerías ggplot2.

Consideraciones éticas

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, el proyecto de investigación propuesto está sustentado en lo siguiente:

- **Del TÍTULO PRIMERO, Disposiciones Generales, CAPITULO UNICO**
 - **Art. 3°.** La investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan: ...
 - **III.** A la prevención y control de los problemas de salud.
- **Del TÍTULO SEGUNDO, De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, CAPITULO I, Disposiciones Comunes**
 - **Art. 13.** En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.

- **Art. 14.** La Investigación que se realice en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases:
 - **VI.** Deberá ser realizada por profesionales de la salud a que se refiere el artículo 114 de este Reglamento, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud que actúe bajo la supervisión de las autoridades sanitarias competentes y que cuente con los recursos humanos y materiales necesarios, que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.
 - **X.** Será responsabilidad de la institución de atención a la salud en la que se realice la investigación proporcionar atención médica al sujeto de investigación que sufra algún daño, si estuviere relacionado directamente con la investigación, sin perjuicio de la indemnización que legalmente corresponda.
- **Art. 17.** Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Para efectos de este Reglamento, las investigaciones se clasifican en las siguientes categorías:
 - **II.** Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva; electrocardiograma, termografía, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml. en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio

moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, entre otros.

Además de los apartados referidos, se tiene apego a los **artículos 21, 22 y 24** del presente Reglamento.

Además de lo contenido en el **CAPITULO II, De la Investigación Farmacológica** artículos 65 y 67, así como lo contenido en **TITULO SEXTO, De la Ejecución de la Investigación en las Instituciones de atención a la salud, CAPITULO UNICO, art. 113 al 120.**

El protocolo de investigación cumple con las consideraciones emitidas en el Código de Núremberg, la Declaración de Helsinki, promulgada en 1964 y sus diversas modificaciones incluyendo la actualización de Fortaleza, Brasil 2013, así como las pautas internacionales para la investigación médica con seres humanos, adoptadas por la OMS y el Consejo de Organizaciones Internacionales para Investigación con Seres Humanos; en México, cumple con lo establecido por la Ley General de Salud y el INAI, en Materia de Investigación para la Salud y Protección de Datos Personales. El protocolo será evaluado y aprobado el Comité Local de Investigación en Salud.

El presente estudio presenta un riesgo de bioseguridad grupo 1 (*riesgo individual y poblacional escaso o nulo*), ya que no utilizó material biológico infecto-contagioso; cepas patógenas de bacterias o parásitos; virus de cualquier tipo; material radiactivo de cualquier tipo; animales y/o células y/o vegetales genéticamente modificados; sustancias tóxicas, peligrosas o explosivas; cualquier otro material que ponga en riesgo la salud o la integridad física del personal de salud o los derechohabientes del IMSS o afecte al medio ambiente. Así mismo se declara que en este proyecto no se llevó a cabo

procedimientos de trasplante de células, tejidos u órganos, o de terapia celular, ni se utilizarán animales de laboratorio, de granja o de vida silvestre.

Confidencialidad: Aunado a lo anterior, la información e identidad de pacientes se conserva bajo confidencialidad; por lo tanto, el acceso a la información como los datos personales del paciente, así como datos de la institución y del personal médico y paramédico, sólo es permitido al grupo de trabajo.

En el caso de que los resultados del estudio muestren beneficios para pacientes con las características definidas en los criterios de selección, se elaboraron proyectos de mejora encaminados a unificar criterios clínicos en el servicio correspondiente, que redunde en el beneficio de los pacientes tratados, proporcionando una alternativa segura de tratamiento, contribuyendo al conocimiento científico a través de la difusión de los resultados de la investigación, con el enfoque de mejorar las políticas de salud del servicio de Cardiología Pediátrica y Genética Clínica.

Aspectos de Bioseguridad

El presente estudio representa un riesgo de *bioseguridad Grupo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo)*, ya que la sangre a emplearse se extrae de pacientes que se asumen libres de alguna enfermedad infectocontagiosa. Se trata de un servicio de atención primaria; investigación. Se usó ropa protectora y guantes por el manejo de sangre con un riesgo biológico infecto-contagioso bajo. (40)

Los investigadores declaran que conocen, han leído y cumplirán las normas, reglamentos y manuales de bioseguridad que apliquen al proyecto:

- a) Manual de procedimientos para el manejo y control de residuos biológico-infecciosos tóxico-peligrosos en unidades de atención médica, IMSS.
- b) Manual de bioseguridad en el laboratorio, OMS.

También manifiestamos que existe evidencia documental auditable de que:

- a) Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales que se requieran para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- b) Las instalaciones de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y son adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- c) El equipo que se utilizó se encuentra en estado satisfactorio de operación.
- d) Existen dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación.
- e) Los involucrados en el proyecto, incluyendo a los estudiantes que participen en el mismo, recibieron la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.
- f) Se mantuvieron las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto.

Recogida, etiquetado y transporte de muestras

1. Se siguieron siempre las precauciones normalizadas; se usaron guantes en todos los procedimientos.
2. La toma de sangre de personas estuvo a cargo de personal capacitado.
3. En las flebotomías, se utilizaron dispositivos de seguridad al vacío de un solo uso que permitieron recoger la sangre directamente en tubos de transporte o de cultivo con tapón y que inutilicen la aguja después del uso.
4. Los tubos se colocaron en recipientes apropiados para el transporte al laboratorio y dentro del laboratorio. Los formularios de petición de examen se colocaron en bolsas o sobres impermeables separados.
5. El personal de recepción **no** abrió estas bolsas.

Apertura de tubos de muestras y muestreo del contenido

1. Los tubos de muestras se abrieron con guantes.
2. También se protegieron los ojos y las mucosas (gafas de seguridad de tipo máscara o viseras).
3. Las prendas de protección se usó bata de laboratorio.

4. Para sacar el tapón, éste se utilizó un trozo de papel o de gasa con el fin de evitar salpicaduras.

Descontaminación

Para la descontaminación se usaron hipocloritos y desinfectantes de alto nivel. Las soluciones de hipoclorito recién preparadas contuvieron cloro disponible a razón de 1 g/l para uso general, y de 5 g/l para limpiar derrames de sangre. Para la desinfección de superficies se utilizó glutaraldehído.

Transporte y almacenamiento de Muestras

El DNA a transportarse es DNA genómico humano, sin riesgo infectocontagioso. Se transportó en tubos estériles, sellados herméticamente y en bolsas plásticas debidamente etiquetadas.

Biocustodia

El responsable de las tomas fue el alumno de maestría. Las muestras fueron almacenadas en la Unidad de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional “Ignacio García Téllez” Calle 34 # 439 x 41, col. Industrial, Ex-terrenos “El Fénix” Mérida, Yucatán. Las muestras se encuentran almacenadas, en congruencia con la carta de consentimiento informado hasta por 5 años.

Recursos financieros.

El proyecto fue financiado con recursos propios de la institución que atiende a las unidades de análisis, por recursos propios de los laboratorios colaboradores, así como del propio alumno de maestría.

Alcances y limitaciones: El presente protocolo pretende comprender el comportamiento demográfico de las cardiopatías congénitas en la península de Yucatán, además de dar una posible explicación a su etiología que pueda extrapolarse a otras poblaciones. Tenemos como limitantes que solo nos enfocamos a una parte pequeña de la vasta gama de etiología de las cardiopatías congénitas.

Resultados

El protocolo fue aprobado por el comité local de investigación en salud 3203 del Instituto Mexicano del Seguro Social Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “Ignacio García Téllez”, según consta en el Número de Registro Institucional R-2019-3203-019. Se recibió autorización de la Dirección del IMSS UMAE Yucatán para el ingreso y análisis de expedientes y registros de la consulta en el archivo clínico del hospital, así como toma de muestras y recabar datos sociodemográficos de los pacientes.

Sujetos de Estudio

Se incluyeron 24 pacientes con diagnóstico de cardiopatía congénita conotruncal (**Tabla 9**), a través de la consulta externa de cardiopediatría del IMSS UMAE Yucatán. Todos los tutores o representantes legales que se incluyeron en el protocolo firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

Tabla 9. Distribución por Sexo.

Característica	Número de Sujetos	Porcentaje
Hombres	16	66.66%
Mujeres	8	33.33%

Distribución por Diagnóstico

De los 24 pacientes reclutados se obtuvieron los siguientes diagnósticos (**Figura 11**): Tetralogía de Fallot: 16 casos (66.6%), transposición de los grandes vasos sin ventrículo único: 3 casos (12.5%), tronco arterioso: 1 caso (4.1%), doble tracto de salida del ventrículo derecho: 0 casos (0%), atresia pulmonar con comunicación interventricular: 4 casos (16.66%), arco aórtico interrumpido tipo B: 0 casos.



Figura 11. Proporción de cardiopatías congénitas conotruncales en los sujetos reclutados de Enero – Diciembre 2020.

Estandarización de los Cebadores

Se utilizaron cebadores comerciales estandarizados (ThermoFisher®, No. 4400291, Assay ID: Hs02267325_cn) que hibridan en la secuencia del exón 3 del gen *TBX1* localizado en el locus 22q11.2 (HGNC:11592). (**Figura 12**)

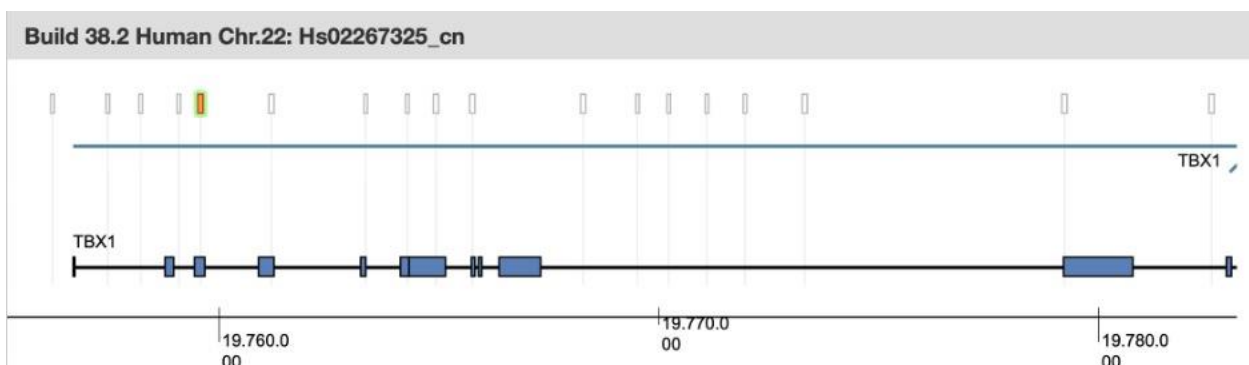


Figura 12. Diagrama que muestra el gen *TBX1* y sus exones. En amarillo se señala la posición del cebador, ubicado en el exón 3.

Se utilizaron cebadores del gen *RPPH1* que codifica al componente H1 de la ribonucleasa P de RNA (HGNC:19273) como estándar de referencia (*housekeeping*) para el análisis estandarizado de qPCR múltiple (ThermoFisher® No. 4403326). El cebador de referencia amplifica un amplicón de 87 pares de bases en el exón 1 del gen *RPPH1*, y es referencia en ensayos de número de copias debido a que se conoce que existen solo dos copias para dicho gen, sin contar con pseudogénes u otras secuencias que alteren el análisis del ensayo de cuantificación de número de copias.

Se realizó una primera corrida para comprobar que los controles y los cebadores amplificaban de manera correcta (**Figura 13**), además de que los cálculos arrojados del ciclo umbral predecían de manera correcta al control positivo (síndrome 22q11.2; monoalélico) y al control negativo (sano, bialélico) con un umbral de dosis normal de 0.66 (**Tabla 10**)

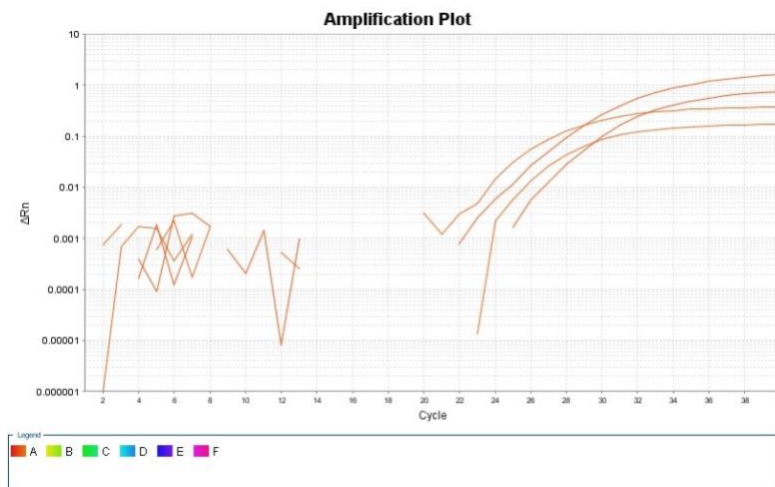


Figura 13. Muestra la curva de amplificación (Fluorescencia VS Ciclo) del control positivo (monoalélico) y control negativo (bialélico), para el gen de referencia (*RPPH1*) y el gen de interés (*TBX1*).

Tabla 10. Ciclos umbrales (CT) de las muestras control y su predicción de los alelos, así como su interpretación.

Muestra	C _T promedio (RPPH1)	C _T promedio (TBX1)	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}	No. Alelos (predicción)	Interpretación
Control -	26.909	27.558	0.6488	0	1	2	Normal
Control +	26.523	27.801	1.278	0.629125	0.6465	1	Delección

En la **Tabla 11** se muestran los datos de fluorescencia obtenidos en la qPCR para cada uno de los pacientes; el ciclo umbral (C_T) del gen de referencia (*RPPH1*) y el gen de estudio (*TBX1*), así como el cálculo del 2^{-ΔΔC_T} y su predicción de dosis génica corroborado por el programa CopyCaller®. Nótese que fue eliminado el paciente 15 debido a que la muestra de DNA presentó degradación, corroborada por electroforesis en gel de agarosa.

Se identificaron 2 casos con alteración de la dosis génica en *TBX1*, un paciente de sexo masculino con diagnóstico de transposición de los grandes vasos y otra paciente de sexo femenino con diagnóstico cardiológico de tronco arterioso, ambas cardiopatías consideradas muy graves dentro del espectro de cardiopatías congénitas conotruncuales. Ambos casos tuvieron un valor menor a 0.7 en el cálculo de dosis génica (**Figura 14, Figura 15**Figura 16).

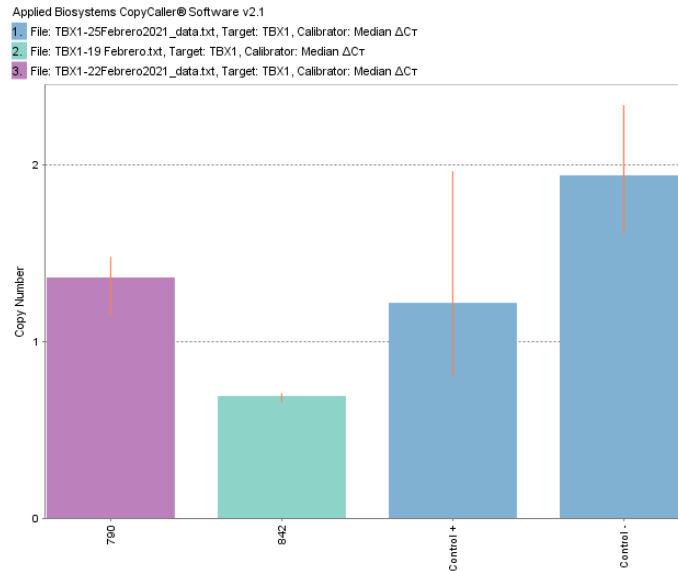


Figura 14. Gráfica obtenida del software CopyCaller que contiene las predicciones de los dos pacientes positivos a delección 22q11.2 (790 y 842) con los respectivos controles.

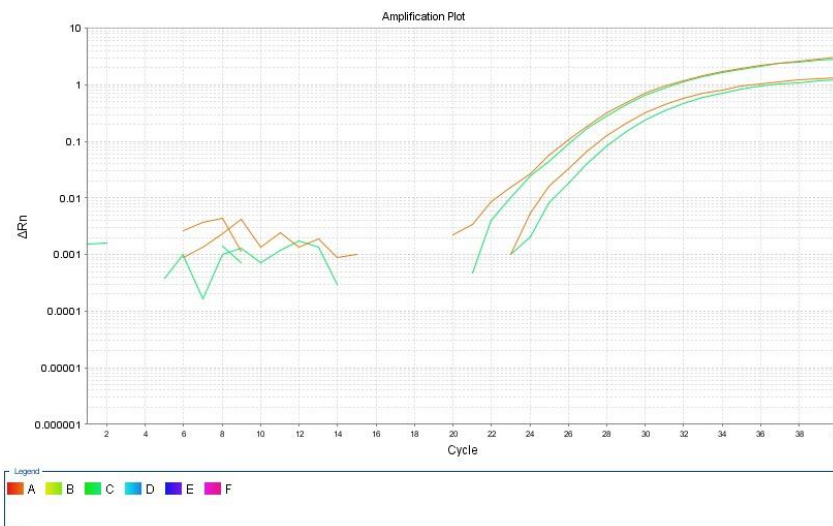


Figura 15. Gráfica de amplificación de qPCR de la muestra 790 (verde) y su control negativo (Amarillo).

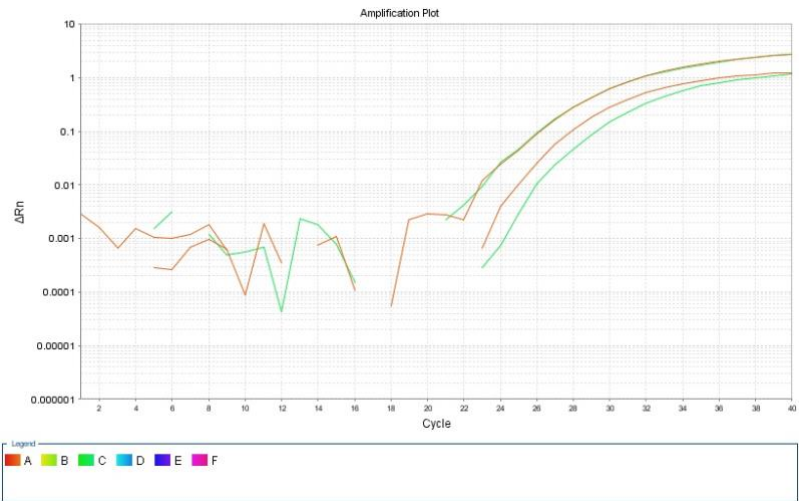


Figura 16. Gráfica de amplificación de qPCR de la muestra 842 (verde) y su control negativo (Amarillo).

Tabla 11. Cálculo de la dosis génica mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ la predicción es apoyada por el software CopyCaller. Se utilizó un umbral de 0.7 para la determinación de microdelección.

Paciente	No. Laboratorio	C_T promedio (RPPH1)	C_T promedio (TBX1)	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	No. Alelos (predicción)	Interpretación
1	662	26.12	27.62	1.50	0.31	0.81	2	Normal
2	772	29.94	31.05	1.11	0.30	0.81	2	Normal
3	779	28.94	28.36	-0.58	-0.60	1.52	2	Normal
4	788	27.13	28.40	1.28	0.47	0.72	2	Normal
5	789	27.72	28.96	1.25	0.44	0.74	2	Normal
6	790	27.90	28.51	0.61	0.58	0.67	1	Delección
7	791	27.25	28.44	1.19	0.38	0.77	2	Normal
8	798	28.20	28.76	0.56	-0.09	1.06	2	Normal
9	799	29.04	30.26	1.23	0.42	0.75	2	Normal
10	800	29.81	30.04	0.24	-0.57	1.48	2	Normal
11	810	28.04	28.27	0.23	-0.58	1.49	2	Normal
12	811	26.01	28.39	2.38	0.41	0.75	2	Normal
13	812	34.20	32.55	-1.65	-0.60	1.52	2	Normal
14	818	23.84	25.88	2.04	0.45	0.73	2	Normal
15	819	Eliminado (DNA degradado)						
16	842	27.81	28.27	0.46	1.42	0.37	1	Delección
17	843	29.33	28.14	-1.18	-0.23	1.17	2	Normal
18	814	26.13	26.20	0.08	0.05	0.97	2	Normal
19	876	23.50	25.83	2.33	0.36	0.78	2	Normal
20	851	28.11	26.84	-1.28	-0.32	1.25	2	Normal
21	877	28.48	28.83	0.35	0.32	0.80	2	Normal
22	881	28.59	27.17	-1.42	-0.46	1.37	2	Normal
23	880	26.24	28.36	2.12	0.15	0.90	2	Normal
24	888	26.30	27.32	1.01	0.37	0.78	2	Normal

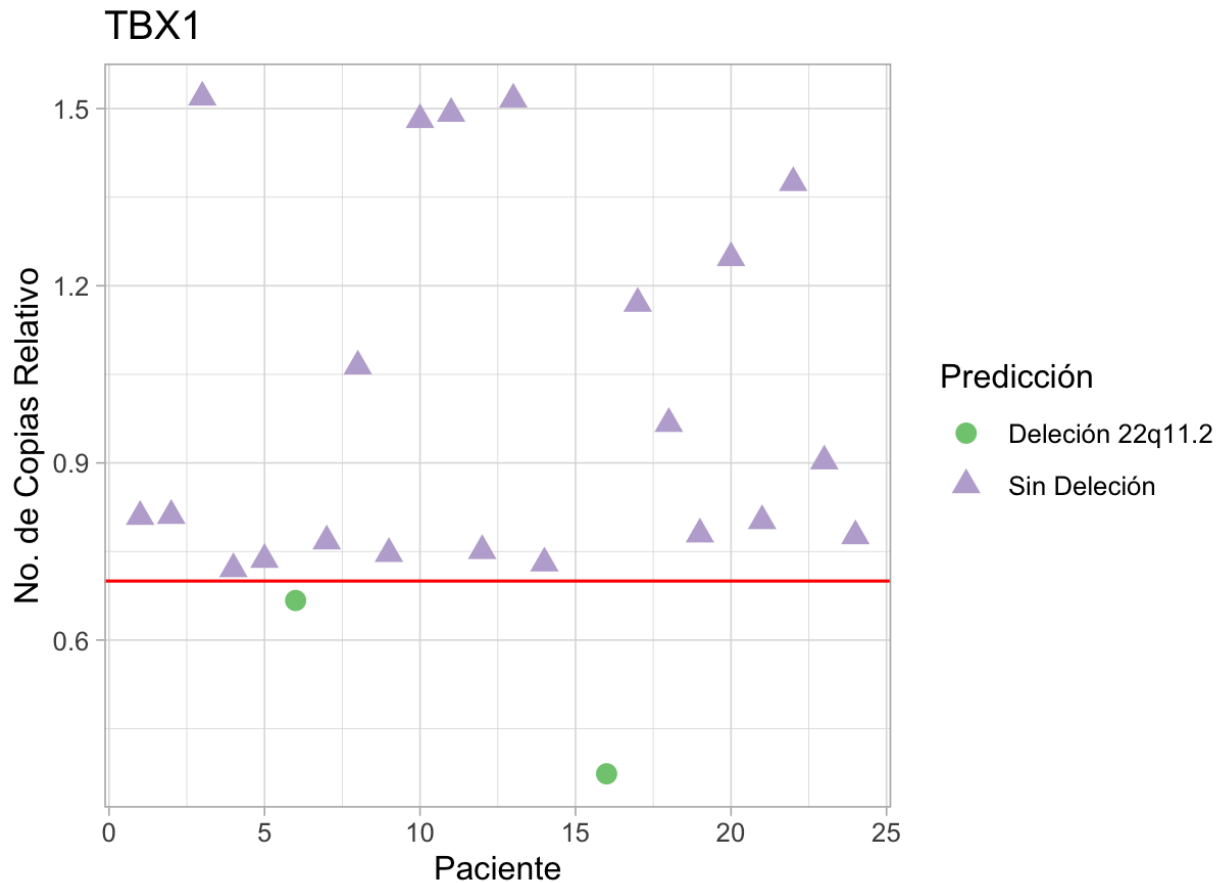


Figura 17. Gráfico que muestra los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para los diferentes pacientes, así como su predicción. La línea roja marca el umbral de 0.7 para decisión de microdelección. Los puntos verdes muestran los valores para los pacientes con predicción de delección 22q11.2

Se determinó la frecuencia de la delección 22q11.2 en la muestra de pacientes con cardiopatía congénita conotruncal obteniendo una frecuencia de 8.33%. Igualmente se obtuvieron las características demográficas de los pacientes (**Tabla 12**), siendo originarios de la península de Yucatán (Quintana Roo y Yucatán), así como que ambos pacientes se encuentran vivos y en seguimiento por parte de cardiopediatría. El paciente de sexo masculino (paciente 6), sin antecedentes heredofamiliares, presenta transposición de los grandes vasos y comunicación interventricular, frente amplia, hipoplasia medio facial y nariz bulbosa. La paciente de sexo femenino (paciente 16), sin antecedentes heredofamiliares, presenta atresia pulmonar, post-operada de fístula sistémico pulmonar, hipoplasia medio facial, hélix plegado, narinas hipoplásicas.

Tabla 12. Resumen de las características clínicas y demográficas de los pacientes con microdeleción.

Paciente	Edad	Estado	Sexo	Origen	Diagnóstico	Fenotipo
6	7 años	Vivo	M	Quintana Roo	Transposición de los grandes vasos Comunicación interventricular	Frente amplia, hipoplasia medio facial, nariz bulbosa.
16	1 año	Viva	F	Yucatán	Atresia pulmonar	Post-operada fistula sistémico pulmonar. Hipoplasia medio facial, hélix plegado, narinas hipoplásicas

Discusión

Según el último reporte publicado en 2013 (1), la tasa de prevalencia de malformaciones en Yucatán es de 102.8 por 10,000 nacimientos, lo cual está por arriba de la tasa nacional de 73.9 por 10,000 nacimientos. En un análisis sociodemográfico realizado para el presente estudio se encontró que las cardiopatías congénitas diagnosticadas durante 2019 fueron de 131 pacientes, calculando una incidencia de cardiopatía congénita de 63.3 x 10,000 RNV en la península de Yucatán, cifra que rebasa el promedio nacional publicado y se induce que dos tercios de todos los pacientes con algún defecto de nacimiento en la península de Yucatán corresponden a una cardiopatía congénita.

Con respecto a las cardiopatías congénitas conotruncuales, encontramos una incidencia de 5.3 x 10,000 RNV, basados en los datos recabados en la consulta de cardiopediatría del 2019 que reporta 11 pacientes con diagnóstico clínico y por gabinete de alguna cardiopatía congénita conotruncal, lo cual corresponde a que 1 de cada 16 consultas de primera vez (6%) corresponde a una cardiopatía congénita conotruncal, lo cual es más alto que el promedio nacional de cardiopatías congénitas conotruncuales de 0.2 x 10,000 RNV(2) . Esta incidencia, crece en proporción con las cardiopatías congénitas en general, pero no se puede descartar de que exista un factor que eleve la incidencia de este subgrupo de cardiopatías congénitas en nuestra población.

La proporción de diagnósticos de cardiopatías conotruncales es igual a la reportada a nivel internacional (23, 41), siendo la Tetralogía de Fallot la cardiopatía congénita conotruncal más frecuente en la población estudiada, seguido de la transposición de los grandes vasos, doble salida de ventrículo único, tronco arterioso y atresia pulmonar con comunicación interventricular.

Se aislaron los casos de cardiopatía congénita conotruncal del 2019, obteniendo las siguientes frecuencias: Tetralogía de Fallot: 18 casos (72%), transposición de los grandes vasos sin ventrículo único: 5 casos (20%), tronco arterioso: 0 casos (0%), doble tracto de salida del ventrículo derecho: 2 casos (8%), atresia pulmonar con comunicación interventricular: 0 casos (0%), arco aórtico interrumpido tipo B: 0 casos (0%).

El índice de mortalidad de los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal es del 24.8%, la cual es superior a los reportes internacionales (3) que reportan entre el 6 – 16% de mortalidad. Siendo los pacientes con tronco arterioso los que presentan mayor mortalidad, seguido de transposición de los grandes vasos, doble tracto de salida de ventrículo derecho, atresia pulmonar con CIV y finalmente tetralogía de Fallot.

Tabla 13. Tasa de letalidad de cardiopatías congénitas troncoconales en la península de Yucatán.

Cardiopatía Congénita Conotruncal	No. De Casos	Casos Fallecidos	Tasa de letalidad (por 100 casos)
Tetralogía de Fallot	37	3	8.1
Transposición de los grandes vasos sin ventrículo único	19	10	52.6
Tronco Arterioso	7	4	57.1
Doble Tracto de Salida del Ventrículo Derecho	14	5	35.7
Atresia Pulmonar + CIV	24	3	12.5

Reportamos una frecuencia de 8.3% de microdelección en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal, lo cual está en línea con lo publicado en otros países (**Tabla 2**). Siendo similar a las frecuencias reportadas por Estados Unidos de America (5-10%), India (6%), China (6%). No existen reportes publicados de frecuencias de síndrome 22q11.2 en México, ya sea en pacientes con o sin cardiopatía congénita conotruncal, por lo que nuestros resultados ofrecen una primera aproximación al estado actual de la enfermedad.

No existen reportes de frecuencia del síndrome 22q11.2 en la península de Yucatán, el presente estudio comprueba que parte de la etiología de las cardiopatías congénitas en la región es de origen genético y que se requiere continuidad en el diagnóstico para profundizar sobre la etiología.

En el presente estudio no se encontraron microduplicaciones del locus 22q11.2, esto puede ser explicado debido a que es un síndrome genómico poco frecuente con algunos casos publicados en la literatura.

El abordaje del gen *TBX1* en el locus 22q11.2 mediante reacción en cadena de la polimeraza en tiempo real fue implementado con éxito en el laboratorio, sin embargo se requiere de mayor experiencia para mejorar las condiciones de la PCR y evitar reprocesamientos. El abordaje con la tecnología TaqMan es menos complicada que el abordaje con Syber Green, debido a que no requiere de curvas de calibración y los cebadores se encuentran estandarizados. El abordaje de *TBX1* mediante qPCR podría ser implementado como método de tamiz para los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal previo al estándar de oro (microarreglos), sin embargo es necesaria la realización de un ensayo clínico para la validación.

El fenotipo de los pacientes diagnosticados con microdelección 22q11.2 se encuentra un paciente de sexo masculino de 7 años de edad (paciente 6), originario de Quintana Roo, sin antecedentes familiares de enfermedades cardiovasculares, con diagnóstico cardiovascular de transposición de los grandes vasos, comunicación interventricular.

Además, presenta algunas dismorfias faciales descritas en el fenotipo sindrómico. Igualmente, una paciente de sexo femenino de 1 año de edad (paciente 16), originaria de Yucatán, sin antecedentes familiares cardiovasculares, con diagnóstico de atresia pulmonar, además de dismorfias características del fenotipo sindrómico. Notamos que es más frecuente la microdelección en cardiopatías consideradas muy graves y con pobre pronóstico (transposición de los grandes vasos / atresia pulmonar), en cambio, no se encontró la microdelección en pacientes con otras cardiopatías congénitas conotruncuales de mejor pronóstico. A diferencia de otros estudios, no encontramos la microdelección en pacientes con diagnóstico de tetralogía de Fallot.

El diagnóstico molecular permitirá a las familias de los pacientes positivos tener un diagnóstico certero, dar seguimiento puntual a posibles comorbilidades (inmunodeficiencia, hipocalcemia, enfermedades renales, trombocitopenia) que puedan disminuir la calidad y la esperanza de vida de los pacientes. Igualmente está reportado, que un diagnóstico molecular preciso ayuda a los cirujanos cardiovasculares a tener un mejor abordaje quirúrgico en caso de ser indicada cirugía. (11)

El presente estudio responde que un porcentaje de las cardiopatías congénitas en la península de Yucatán tiene etiología genética y la importancia de su estudio. Sin embargo, las cardiopatías congénitas tienen etiología multifactorial, y son necesarios estudios avanzados de relación gen – ambiente para explicar la importante incidencia de esta malformación en la península de Yucatán. Sin embargo, tenemos como limitante la muestra pequeña, aunque estadísticamente representativa, y se puede plantear realizar el estudio al resto de los miembros de la población con diagnóstico confirmado de cardiopatía congénita conotruncal. Sería conveniente realizar estudios de confirmación a través de citogenética molecular (FISH o aCGH) para el cálculo de sensibilidad y especificidad como método de tamiz para síndrome 22q11.2. Así mismo se plantea agregar más sondas de la región de interés para poder encontrar aquellos pacientes que tengan una microdelección en el locus 22q11.2, pero que no involucre al gen *TBX1*, con las implicaciones de elevación de costos e interpretación de resultados más complejos,

que permitan genotipificar de manera más precisa a los pacientes y realizar asociación genotipo – fenotipo.

CONCLUSIONES

Posterior al análisis de la dosis génica del gen *TBX1* en la región 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal, de los 24 pacientes analizados, 2 mostraron diferencia disminuida en el número de copias con una predicción a microdelección.

Sugerimos que la microdelección es más probable en aquellos pacientes con cardiopatía congénita conotruncal grave (trasposición de los grandes vasos / atresia de arterias pulmonares).

Basados en estas conclusiones de trabajo, se sugiere progresar hacia una siguiente etapa de investigación donde se comparen nuestros hallazgos con el estándar de oro (FISH) y un diseño metodológico que permita proponer este estudio como método de diagnóstico para los pacientes con sospecha de síndrome 22q11.2, permitiendo así un diagnóstico oportuno, prevención de comorbilidades y que el conocimiento científico obtenido sea de utilidad en el tratamiento integral de los pacientes con cardiopatía congénita.

REFERENCIAS

1. Navarrete E, Canún S, Reyes A, et al. Prevalencia de malformaciones congénitas registradas en el certificado de nacimiento y de muerte fetal. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2013; 70: 499–505.
2. Navarrete-Hernández E, Canún-Serrano S, Valdés-Hernández J, et al. Malformaciones congénitas al nacimiento: México, 2008-2013. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2017; 74: 301–308.
3. Buber J, Valente AM. Predicting survival in adults with congenital heart disease: what are the odds? *Heart* 2018; 104: 1643–1644.
4. Brickner ME, Hillis LD, Lange RA. Congenital Heart Disease in Adults. *N Engl J Med* 2000; 342: 256–263.
5. Carlson BM. Developmental Biology and Human Embryology. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2015. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1016/b978-0-12-801238-3.07822-3.
6. Gittenberger-De Groot AC, Bartelings MM, Deruiter MC, et al. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations. *Pediatr Res* 2005; 57: 169–176.
7. Lindsay EA. Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 858–868.
8. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Prim* 2015; 1: 15071.
9. Hasten E, McDonald-McGinn DM, Crowley TB, et al. Dysregulation of TBX1 dosage in the anterior heart field results in congenital heart disease resembling the 22q11.2 duplication syndrome. *Hum Mol Genet* 2018; 27: 1847–1857.
10. Johnson TR. Conotruncal cardiac defects: A clinical imaging perspective. *Pediatr Cardiol* 2010; 31: 430–437.
11. Cuturilo G, Drakulic D, Jovanovic I, et al. The Impact of 22q11.2 Microdeletion on Cardiac Surgery Postoperative Outcome. *Pediatr Cardiol* 2017; 38: 1680–1685.
12. Van L, Heung T, Graffi J, et al. All-cause mortality and survival in adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med* 2019; 0: 1–8.
13. Unolt M, Versacci P, Anaclerio S, et al. Congenital heart diseases and cardiovascular abnormalities in 22q11.2 deletion syndrome: From well-established knowledge to new frontiers. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 2018; 176: 2087–2098.
14. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore M. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®, <https://omim.org/> (2021).
15. Emanuel BS. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev* 2008; 14: 11–18.
16. Muntean I, Togănel R, Benedek T. Genetics of Congenital Heart Disease: Past and Present. *Biochem Genet* 2017; 55: 105–123.
17. Kruszka P, Addissie YA, McGinn DE, et al. 22Q11.2 Deletion Syndrome in Diverse Populations. *Am J Med Genet Part A* 2017; 173: 879–888.
18. Nogueira S, Bellucco F, Kulikowski L, et al. 22q11 . 2 Deletion in Patients with Conotruncal Heart Defect and del22q Syndrome Phenotype. *Arq Bras Cardiol*

- 2009; 92: 307–3011.
19. Poirsier C, Besseau-Ayasse J, Schluth-Bolard C, et al. A French multicenter study of over 700 patients with 22q11 deletions diagnosed using FISH or aCGH. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 844–851.
 20. Lammer EJ, Chak JS, Iovannisci DM, et al. Chromosomal abnormalities among children born with conotruncal cardiac defects. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 2009; 85: 30–35.
 21. Bellucco FTDS, Belangero SIN, Farah LMS, et al. Investigating 22q11.2 deletion and other chromosomal aberrations in fetuses with heart defects detected by prenatal echocardiography. *Pediatr Cardiol* 2010; 31: 1146–1150.
 22. Wozniak A, Wolnik-Brzozowska D, Wisniewska M, et al. Frequency of 22q11.2 microdeletion in children with congenital heart defects in western Poland. *BMC Pediatr* 2010; 10: 88.
 23. Agergaard P, Olesen C, Østergaard JR, et al. The prevalence of chromosome 22q11.2 deletions in 2,478 children with cardiovascular malformations. A population-based study. *Am J Med Genet Part A* 2012; 158 A: 498–508.
 24. Anilkumar A, Kappanayil M, Thampi M V., et al. Variation in prevalence of chromosome 22q11 deletion in subtypes of conotruncal defect in 254 children. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2011; 100: 97–100.
 25. Xu YJ, Wang J, Xu R, et al. Detecting 22q11.2 deletion in Chinese children with conotruncal heart defects and single nucleotide polymorphisms in the haploid TBX1 locus. *BMC Med Genet* 2011; 12: 169.
 26. Baker K, Sanchez-de-Toledo J, Munoz R, et al. Critical Congenital Heart Disease-Utility of Routine Screening for Chromosomal and Other Extracardiac Malformations. *Congenit Heart Dis* 2012; 7: 145–150.
 27. Peyvandi S, Lupo PJ, Garbarini J, et al. 22q11.2 Deletions in Patients with Conotruncal Defects: Data from 1,610 Consecutive Cases. *Pediatr Cardiol* 2013; 34: 1687–1694.
 28. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, et al. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2018; 176: 2070–2081.
 29. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet* 2007; 370: 1443–1452.
 30. Carotti A, Digilio MC, Piacentini G, et al. Cardiac defects and results of cardiac surgery in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 2008; 14: 35–42.
 31. Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Larson JM, et al. Multiplexed quantitative real-time PCR to detect 22q11.2 deletion in patients with congenital heart disease. *Physiol Genomics* 2010; 42A: 52–60.
 32. Liao HC, Liao CH, Kao SM, et al. Detecting 22q11.2 Deletion Syndrome in Newborns with Low T Cell Receptor Excision Circles from Severe Combined Immunodeficiency Screening. *J Pediatr* 2019; 204: 219-224.e1.
 33. Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, et al. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat* 2006; 27: 814–821.
 34. Sivertsen Å, Lie RT, Wilcox AJ, et al. Prevalence of duplications and deletions of the 22q11 DiGeorge syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A: 129–134.

35. Bahamat AA, Assidi M, Lary SA, et al. Use of Array Comparative Genomic Hybridization for the Diagnosis of DiGeorge Syndrome in Saudi Arabian Population. *Cytogenet Genome Res* 2018; 154: 20–29.
36. Choi BG, Hwang SK, Kwon JE, et al. Array comparative genomic hybridization as the first-line investigation for neonates with congenital heart disease: Experience in a single tertiary center. *Korean Circ J* 2018; 48: 209–216.
37. Huber J, Peres VC, de Castro AL, et al. Molecular Screening for 22Q11.2 Deletion Syndrome in Patients With Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol* 2014; 35: 1356–1362.
38. Scheaffer RL, Mendenhall W, Ott R, et al. *Elementary Survey Sampling*. 7th ed. Advanced Series, 2012.
39. Guna A, Butcher NJ, Bassett AS. Comparative mapping of the 22q11.2 deletion region and the potential of simple model organisms. *J Neurodev Disord*; 7. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1186/s11689-015-9113-x.
40. World Health Organization. *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*. 3rd ed. WHO, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42981> (2004).
41. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, et al. Genetics of Congenital Heart Disease. *Circ Res* 2013; 112: 707–720.

ANEXOS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (padres o representantes legales de niños o personas con discapacidad)

Nombre del estudio:	Identificación de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR
Patrocinador externo (si aplica)*:	No aplica
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	Se invita a su hijo a participar en un estudio que ayudará a explicar el origen de su enfermedad en el corazón al buscar variaciones en su material genético. Lo anterior permitirá realizar un diagnóstico específico en su hijo, ayudar a su médico a tomar mejores decisiones de tratamiento y saber si esta condición puede heredarse.
Procedimientos:	Si usted acepta que su hijo participe en el estudio, se le hará un cuestionario sobre algunos datos que le tomará 10 minutos de su tiempo y se le tomará muestra de sangre equivalentes a unas gotitas. Si su hijo tiene menos de seis meses de edad, esta punción se realizará en el talón; si su hijo tiene mas de seis meses de edad, la muestra se obtendrá de una vena del codo.
Posibles riesgos y molestias:	Las molestias del estudio consisten exclusivamente en la punción que se requerirá para obtener la sangre, no tiene costo alguno y las preguntas que se le harán podrían resultar incómodas, pero puede negarse a contestarlas en cualquier momento. El riesgo que existe es que después de la punción permanezca un moretón pequeño que en días posteriores debe desaparecer, menos frecuentemente infección del sitio, daño a nervio o fístula arteriovenosa.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Este estudio le proporcionará información acerca de la enfermedad de su hijo, además de que los resultados aportarán información nueva e importante sobre que tan frecuentemente se presentan los daños en los genes que se están estudiando.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Nos comprometemos a comunicarle los resultados del estudio en cuanto estén disponibles, estos se le entregaran de manera personal. Si durante el desarrollo del estudio surge información importante acerca de opciones de tratamiento que sean más efectivas, el equipo de investigadores se compromete a brindarle dicha información.
Participación o retiro:	Usted tiene le derecho de realizar preguntas o retirar a su hijo(a) de la intervención en el momento que usted lo considere; así mismo es libre de decidir si su hija(a) participa en este estudio sin que esto afecte la atención que recibe del IMSS
Privacidad y confidencialidad:	No se identificará la participación de su hijo(a) en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y los datos personales serán manejados en forma confidencial y anónima, solo podrán ser vistos por el investigador principal y colaboradores, no se utilizará el nombre de su hijo(a) ni sus iniciales y no se podrá asociar la participación con los resultados de las mediciones sanguíneas o corporales. Los datos obtenidos serán resguardados por los investigadores en archivos privados a los que solo los investigadores tienen acceso. Si durante el desarrollo del estudio surge información importante acerca de opciones de tratamiento que sean más efectivas, el equipo de investigadores se compromete a brindar dicha información a los participantes junto su padre o tutor. Los datos personales serán codificados y protegidos de tal manera que solo pueden ser identificados por los Investigadores de este estudio o, en su caso, de estudios futuros. Las muestras serán almacenadas por los investigadores por el tiempo que usted autorice.

Declaración de consentimiento:

Después de haber leído y habiéndoseme explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

No acepto que mi familiar o representado participe en el estudio.

Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra solo para este estudio.

Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su sangre hasta por ____ años tras lo cual se destruirá la misma.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador Responsable:

Dra. Carolina Elizabeth Medina Escobedo (Matrícula 10632905, UMAE Yucatán, Teléfono 9999225656 Extensión 61677)

Colaboradores:

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz (Instituto Conde de Valenciana, Ciudad de México. Teléfono: 5554421700)

Dr. Félix Julián Campos García (Matrícula 98360914, UMAE Yucatán, Celular 9993701913)

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal

Testigo 1

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Clave: 2810-009-014



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

**CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN
(NIÑOS, ADOLESCENTES O PERSONAS CON DISCAPACIDAD)**

Nombre del estudio:	Identificación de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	Se me invita a participar en un estudio que ayudará a explicar el origen de mi enfermedad en el corazón al buscar variaciones en mi material genético; lo anterior permitirá realizar un diagnóstico específico de mi enfermedad, además de que ayudara a los médico a tomar mejores decisiones de mi tratamiento y saber si esta enfermedad se puede heredar..
Procedimientos:	Si acepto participar en el estudio, se me hará un cuestionario sobre algunos datos que me tomará 10 minutos llenarlo y se me tomará una muestra de sangre de una de las veas del codo.
Posibles riesgos y molestias:	Se me ha explicado que las molestias del estudio consisten exclusivamente en la punción que se requerirá para obtener la sangre, que no tiene costo alguno y que las preguntas que se me harán podrían resultarme incómodas, pero puedo negarme a contestarlas en cualquier momento. El único riesgo que existe es que después de la punción permanezca un moretón pequeño que en días posteriores debe desaparecer.
Posibles beneficios que recibirás al participar en el estudio:	Este estudio me proporcionará información acerca de mi enfermedad, además de que los resultados aportarán información nueva e importante sobre que tan frecuentemente se presentan los daños en los genes que se están estudiando.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Los investigadores se comprometen a comunicarme los resultados del estudio en cuanto estén disponibles, se me proporcionaran de manera personal acompañado de mi padre, madre o tutor.
Participación o retiro:	Tengo el derecho a realizar preguntas o aclarar dudas acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Me han hecho saber que tengo derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo desee o que mi padre o tutor lo considere conveniente, sin que ello afecte mi situación como derechohabiente de IMSS.
Privacidad y confidencialidad:	No se identificará mi participación en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y mis datos personales serán manejados en forma confidencial y anónima, solo podrán ser vistos por el investigador principal y colaboradores, no se utilizará mi nombre ni mis iniciales y no se podrá asociar mi participación con los resultados de mis mediciones sanguíneas o corporales. Si durante el desarrollo del estudio surge información importante acerca de opciones de tratamiento que sean más efectivas, el equipo de investigadores se compromete a brindar dicha información a los participantes junto con tu padre o tutor. Las muestras serán almacenadas por los investigadores por el tiempo que usted autorice.
Declaración de consentimiento: Después de haber leído y habiendoseme explicado todas mis dudas acerca de este estudio:	
<input type="checkbox"/>	No acepto participar en el estudio.
<input type="checkbox"/>	Si acepto participar y que se tomen la muestras solo para este estudio.
<input type="checkbox"/>	Si acepto participar y que se tomen la muestras para este estudios y estudios futuros, conservando mi sangre hasta por dos años tras lo cual se destruirá.
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Dra. Carolina Medina Escobedo, médico no familiar adscrita a la Unidad de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Mérida, Yucatán. Teléfono: 922 56 56 ext. 61677 de lunes a viernes de 8:00 a 14:00 hrs. Correo carolina.medina@imss.gob.mx
Colaboradores:	Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz (Instituto Conde de Valenciana, Ciudad de México. Teléfono: 5554421700)

Dr. Félix Julián Campos García, estudiante de maestría de ciencias médicas en la Unidad de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Mérida, Yucatán. Teléfono: 922 56 56 ext. 61677 de lunes a viernes de 8:00 a 14:00 hrs. Correo felixcampos@gmail.com	
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com	
Nombre y firma del participante	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma

Identificación de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR

Medina-Escobedo Carolina,¹ Campos-García Félix-Julián,¹ Zenteno Ruiz Juan,²

¹Unidad de Alta Especialidad HE- CMN "Ignacio García Téllez" Mérida, Yucatán.

²Laboratorio de Genética, Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana".

Anexo 2: Hoja de recolección de datos

FECHA:		No. Consecutivo			
NOMBRE:					
NSS:					
SEXO:		EDAD:			
DIRECCIÓN:					
TELÉFONOS:					
DIAGNÓSTICO CARDIOLÓGICO:					
<i>Criterios de Inclusión</i>		<i>Criterios de Eliminación</i>			
Edad: recién nacidos hasta 15 años de edad.	<i>Si cumple</i>	Pacientes con diagnóstico confirmado de otro síndrome genético. (ejemplo: síndrome de Down).	<i>Si</i>		
	<i>No cumple</i>		<i>No</i>		
Sexo: masculino/femenino	<i>Masculino</i>	Madre con diabetes gestacional, fenilcetonuria o exposición al ácido retinoico.	<i>Si</i>		
	<i>Femenino</i>		<i>No</i>		
Asentimiento firmado (Según el caso)	<i>Si</i>				
	<i>No</i>				
Carta de consentimiento informado firmado por el tutor.	<i>Si</i>				
	<i>No</i>				
<i>Árbol Genealógico</i>					



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud **3203**.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL LIC. IGNACIO GARCIA TELLEZ

Registro COFEPRIS 17 CI 31 050 033
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 31 CEI 005 2017121

FECHA **Miércoles, 11 de diciembre de 2019**

Dra. Carolina Elizabeth Medina Escobedo

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Identificación de microdeleciones y microduplicaciones en el locus 22q11.2 en pacientes con cardiopatía congénita conotruncal mediante qPCR** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**:

Número de Registro Institucional
R-2019-3203-019

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Estudios en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


ROBERTO ABRAHAM BETANCOURT ORTIZ
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3203

IMSS
UMAЕ

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL