



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN
BIOQUÍMICA CLÍNICA

**“ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS MICRO-RNA`S EN PLASMA DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS”**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL:
GRADO DE ESPECIALISTA**

**EN:
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PRESENTA:
QFB. HECTOR ABRAHAM ROSAS CASTAÑEDA**

**TUTOR
Dr. RICARDO GAMBOA AVILA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2023





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.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Martha Menjivar Iraheta.
Vocal	Dra. Virginia Díaz Jiménez.
Secretario	M. en C. Maria Guadalupe Ortiz López.
1er.Suplente	M. en C. Julio César Martínez Álvarez.
2do. Suplente	Dra. Veronica Viñuela Berni.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Fisiología, del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

(Firma)

Asesor del Tema:

Dr. Ricardo Gamboa Avila

(Firma)

Sustentante:

QFB. Hector Abraham Rosas Castañeda

INDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	9
Cardiopatías congénitas	9
Biogénesis de los micro-RNA	13
micro-RNA-let-7e	16
micro-RNA-17	18
micro-RNA-191	18
JUSTIFICACION	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
HIPÓTESIS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Diseño de investigación	22
Población de estudio	22
Tamaño de Muestra	23
Criterios de Selección	23
Variables Clínicas	25
DISEÑO EXPERIMENTAL	26
Estrategias Metodológicas	26
Extracción de RNA total	27
Transcripción reversa	27
Análisis de los micro-RNA y validación de la cuantificación	27
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	28
Descripción de la población	28
Expresión de micro-RNA	30
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	41

PROSPECTIVAS	42
BIBLIOGRAFÍA	43
Anexo 01	49
Anexo 02	50
Anexo 03	51
Anexo 04	60
Anexo 05	61
Anexo 06	62
Anexo 07	63

ABREVIATURAS

CC	Cardiopatía Congénita
cDNA	DNA complementario
SHVI	Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico
INCar	Instituto Nacional de Cardiología
miRNA	micro-RNA
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RISC	Complejo de carga de silenciación inducida por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RT	Retrotranscripción
CIV	Comunicación interventricular
LBH	Gen de desarrollo de extremidades y corazón
SHIV	Síndrome de hipoplasia del ventrículo izquierdo
INPer	Instituto Nacional de Perinatología

RESUMEN

Las cardiopatías congénitas (CC) son los trastornos congénitos más frecuentes en el recién nacido, con más de un 20% de las muertes de lactantes y un aproximado del 40% de las muertes prenatales cada año. A nivel mundial, las investigaciones actuales indican que las cardiopatías congénitas son el defecto congénito más común y afecta a casi 10 a 12 de cada 1000 bebés nacidos vivos. En México se estima una prevalencia de 8 a 10 por cada 1000 recién nacidos con aproximadamente 18,000 a 20,000 casos anuales. Las malformaciones congénitas del sistema circulatorio representaron la primera causa de muerte en pacientes pediátricos, lo cual supondrá una carga creciente para los sistemas de salud, por lo que es necesario estudiar mecanismos y genes involucrados en el desarrollo de esta patología. Se han identificado un gran número de micro-RNA asociados con CC, por lo que su papel biológico se ha convertido en un campo de investigación importante en los últimos años. El objetivo de este trabajo fue, determinar la expresión de los miRNA-let-7e, miRNA-17 y miRNA-191 asociados a CC, para lo cual se analizaron los parámetros clínicos y antropométrico. Se estudiaron a 50 pacientes con CC y 50 pacientes controles. Se tomaron muestras de sangre periférica de cada paciente en tubos con EDTA, para la extracción de RNA, y se determinó la expresión de los micro-RNA mediante la técnica de PCR en tiempo real. Al comparar las expresiones de los micro-RNA de estudio encontramos un aumento significativo en la expresión del miR-17 en pacientes cardiopatas con respecto a los controles, posteriormente al realizar la estratificación en pacientes cianóticos y no cianóticos, se observó un aumento significativo de la

expresión de los miRNA-let-7e, miRNA-17 y miRNA-191 en los pacientes no cianóticos. Posteriormente, se realizó se clasificaron de acuerdo a la edad, con el propósito de conocer si se modifica la expresión de los micro-RNA de acuerdo a la edad; los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión en los pacientes no cianóticos en el micro-RNA let-7e y micro-RNA-191 en relación al aumento de la edad.

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que existe diferencias en las expresiones de los micro-RNA-let-7, micro-RNA-17 y micro-RNA-191 en pacientes con CC (cianóticos y no cianóticos) de diferentes edades.

Este proyecto realizo en el Laboratorio 4 del edificio de investigación del departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” bajo la dirección de:

Dr. Ricardo Gamboa Avila

INTRODUCCIÓN

Cardiopatías congénitas

Las cardiopatías congénitas (CC) son los trastornos congénitos más frecuentes en el recién nacido, con más de un 20% de las muertes de lactantes y un aproximado del 40% de las muertes prenatales cada año, por tal razón, supondrá una carga creciente para los sistemas de salud.¹

A nivel mundial, las investigaciones actuales indican que las cardiopatías congénitas son el defecto congénito más común y afecta a casi 10 a 12 de cada 1000 niños nacidos vivos (1 %–1.2 %) ²⁻⁴. No todas las personas con cardiopatías congénitas son diagnosticadas de forma temprana, por lo que la prevalencia real ha sido difícil determinar, pero una estimación de una prevalencia general es de 13.1 por 1000 niños y 6.1 por 1000 adultos.⁵

En México, no existen bases que registren la frecuencia de esta enfermedad, sin embargo, se estima una prevalencia es de 8-10 por cada 1000 recién nacidos con aproximadamente 18,000 a 20,000 casos anuales.⁶ El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) nos informa que las malformaciones congénitas del sistema circulatorio representaron la primera causa de muerte en pacientes pediátricos, este tipo de enfermedades está presente en todos los grupos de edad, pero el mayor porcentaje corresponde a fallecimientos en niños menores de un año de vida.⁷

Las cardiopatías congénitas son defectos estructurales del corazón o de los grandes vasos, esto debido a diferentes alteraciones que ocurren durante el desarrollo embrionario del corazón entre las semanas 3 y 10 de la gestación.⁸ La etiología de las

cardiopatías congénitas tienen un origen multifactorial, donde aproximadamente el 20% tienen causa conocida, esto debido a efectos teratogénicos y alteraciones genéticas, a pesar de ello, aún se desconoce el 80% restante.⁹

A través de varias décadas de investigación, se han identificado las complejas redes que regulan el desarrollo cardiovascular, se ha enfatizado la importancia de los factores genéticos, así como de los estímulos ambientales en la patogenia de las CC. Recientemente ha surgido un nuevo mecanismo en el que interviene una regulación postranscripcional a través de los micro-RNA como elementos centrales del desarrollo cardiaco embrionario.⁹

Por lo que, actualmente se ha indicado que las desregulaciones de los micro-RNA pueden participar en la aparición de las CC, sin embargo, aún se desconoce los micro-RNA específicos que regulan los diferentes tipos de CC y los mecanismos de los micro-RNA que podrían estar participando.

Los signos y síntomas de las CC van a depender del tipo y de la gravedad del defecto en particular, partiendo desde afecciones simples que no causan síntomas, hasta problemas complejos que causan síntomas graves y potencialmente mortales. En general las CC se clasifican en 2 grandes grupos, según la relación con la presencia de cianosis en diferentes periodos como el neonatal, la lactancia o la niñez.¹⁰

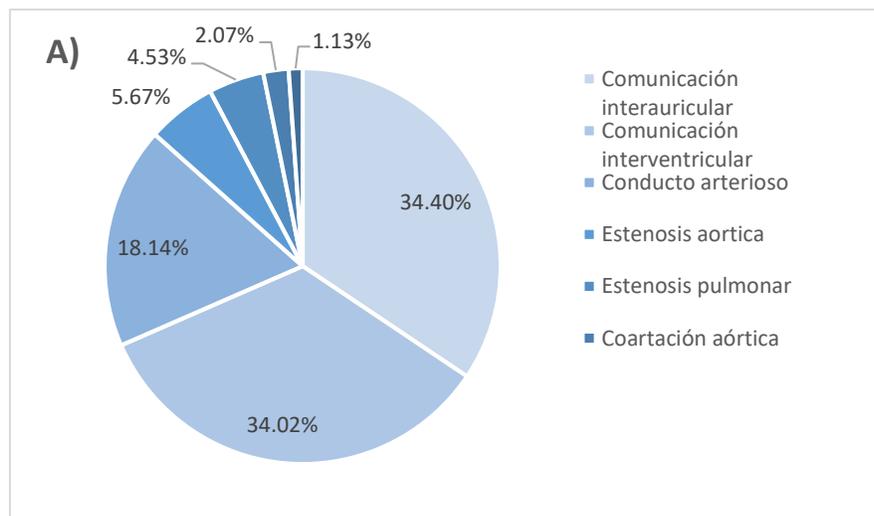
La cianosis es la coloración azulada de la membranas y mucosas debido a un aumento del nivel de hemoglobina desoxigenada. Las CC cianóticas se consideran las formas

más graves de la enfermedad. En este sentido las cardiopatías congénitas se clasifican clínicamente en no cianóticas y cianóticas. **Tabla1.**¹¹

No cianóticas	Cianóticas
Comunicación interventricular	Tetralogía de Fallot
Comunicación interauricular	Transposición de grandes arterias
Conducto arterioso permeable	Retorno venoso pulmonar anómalo completo
Canal auriculoventricular	Doble salida del ventrículo derecho
Estenosis pulmonar	Atresia tricúspide
Estenosis aortica	Atresia pulmonar
Coartación aórtica	

Tabla 1. Clasificación de las cardiopatías congénitas y sus principales afecciones

En la figura 1. se observa la distribución porcentual de las cardiopatías congénitas, en donde la comunicación interventricular y la comunicación auricular son las más frecuentes dentro de las cardiopatías no cianóticas llegando a alcanzar el 60% de prevalencia, mientras que, en las cardiopatías cianóticas, las más prevalentes son el atrio único y la tetralogía de Fallot.¹²



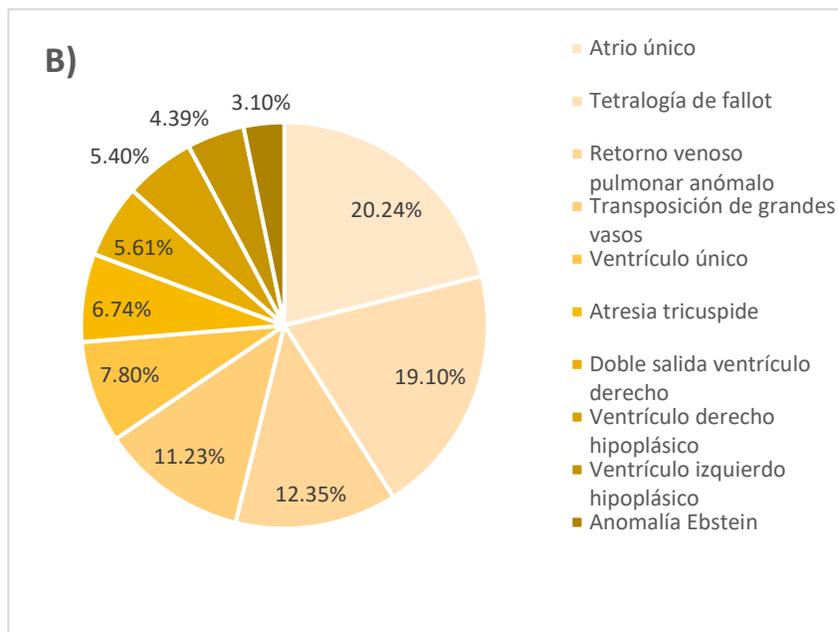


Figura 1. Distribución de la prevalencia de diferentes cardiopatías congénitas **A)** Cardiopatías no cianóticas. **B)** Cardiopatías cianóticas.¹²

En la atención obstétrica actual, las estrategias para diagnosticar las enfermedades del corazón están basadas principalmente en el estudio por ecocardiografía fetal durante el segundo trimestre del embarazo. A pesar de ello, la tasa de detección no supera el 60%, lo que nos indica que una gran proporción de CC no se detectan durante el embarazo. El éxito de la ecocardiografía está profundamente limitado por la calidad del equipo, la competencia del operador y la mala estandarización de los métodos de estudio.¹³

Avances recientes en las técnicas de biología molecular, nos han permitido asociar la relación entre distintas especies moleculares tales como los micro-RNA,

relacionándolos con diversos mecanismos moleculares que participan en la formación del corazón, incluidas las proteínas morfogenéticas óseas y péptidos, ubicados dentro de los dominios funcionales de las proteínas precursoras identificadas como esenciales para el desarrollo del corazón.¹⁴ Se han identificado micro-RNA extracelulares en diferentes biofluidos corporales como: suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, leche materna, orina, lágrimas, calostro, líquido peritoneal, lavado bronquial, líquido seminal y líquido folicular ovárico.¹⁵

Algunos micro-RNA extracelulares se consideran moléculas resultantes de actividades celulares, como lesión celular o muerte. Diversos estudios sugieren que la liberación de los micro-RNA extracelulares, es un proceso regulado que actúan como un sistema de comunicación intercelular regulando la expresión génica y el fenotipo de las células receptoras, participando tanto en respuestas fisiológicas y adaptativas como, en el inicio y desarrollo de estados patológicos. Además, presentan propiedades biológicas y fisicoquímicas apropiadas para constituir biomarcadores útiles en la práctica clínica. Se ha propuesto el uso de micro-RNA como biomarcadores circulantes para el diagnóstico o pronóstico de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes, lo que demuestra que los micro-RNA circulantes son específicos para la patogenia de las enfermedades.¹⁶

Biogénesis de los micro-RNA

Los micro-RNA son una clase de RNA pequeños endógenos de aproximadamente 19–24 nucleótidos de longitud, conservados evolutivamente que funcionan como reguladores postranscripcionales mediante la degradación del mRNA o la inhibición de

la traducción, en ambos casos disminuyen la expresión del gen sobre cuyo mRNA hace diana.¹⁷ Se estima que el 60% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de micro-RNA y que un solo micro-RNA puede regular alrededor de 200 diferentes transcriptos que pueden funcionar en diferentes vías en la célula. Aproximadamente, el 80% de los genes de micro-RNA se encuentran localizados en regiones intrónicas del genoma, y el 20% restante se distribuyen en regiones exónicas y regiones intergénicas.¹⁸

Durante la biogénesis, los micro-RNA siguen múltiples pasos, en la llamada vía canónica de generación de micro-RNA; dónde la gran mayoría de los genes micro-RNA son transcritos por la enzima RNA polimerasa II, aunque en algunos casos la transcripción la lleva a cabo la RNA polimerasa III. En este punto el micro-RNA primario (pri-micro-RNA) puede ser opcionalmente editado por la enzima adenosina desaminasa que actúan sobre el RNA. El pri-micro-RNA es posteriormente procesado en el núcleo por un complejo microprocesador formado por la enzima Drosha, una ribonucleasa de tipo III.¹⁹ Este complejo se une al pri-micro-RNA y realiza mediante drosha, un corte en cada uno de los dos brazos de la horquilla de RNA, siendo los sitios de corte determinados por la proteína DGCR8.²⁰ Posteriormente este es exportado al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el pre-micro-RNA es procesado por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (complejo RISC). Este complejo de carga está compuesto por la ribonucleasa de tipo III, llamada Dicer. Las proteínas que acompañan a Dicer facilitan su acción ribonucleasa, que como resultado, elimina la horquilla de micro-RNA dejando una doble cadena de miRNA.²¹ Tras el corte, el

complejo se desmonta y las hebras de micro-RNA se separan por la acción de una helicasa y el micro-RNA maduro se asocia a la proteína Ago-2 para formar el complejo RISC definitivo. Es este complejo RISC, el que tiene la capacidad de inhibir la expresión del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) diana o degradarlo, el cual viene predeterminado por la secuencia del miRNA.²² **Figura 2.**

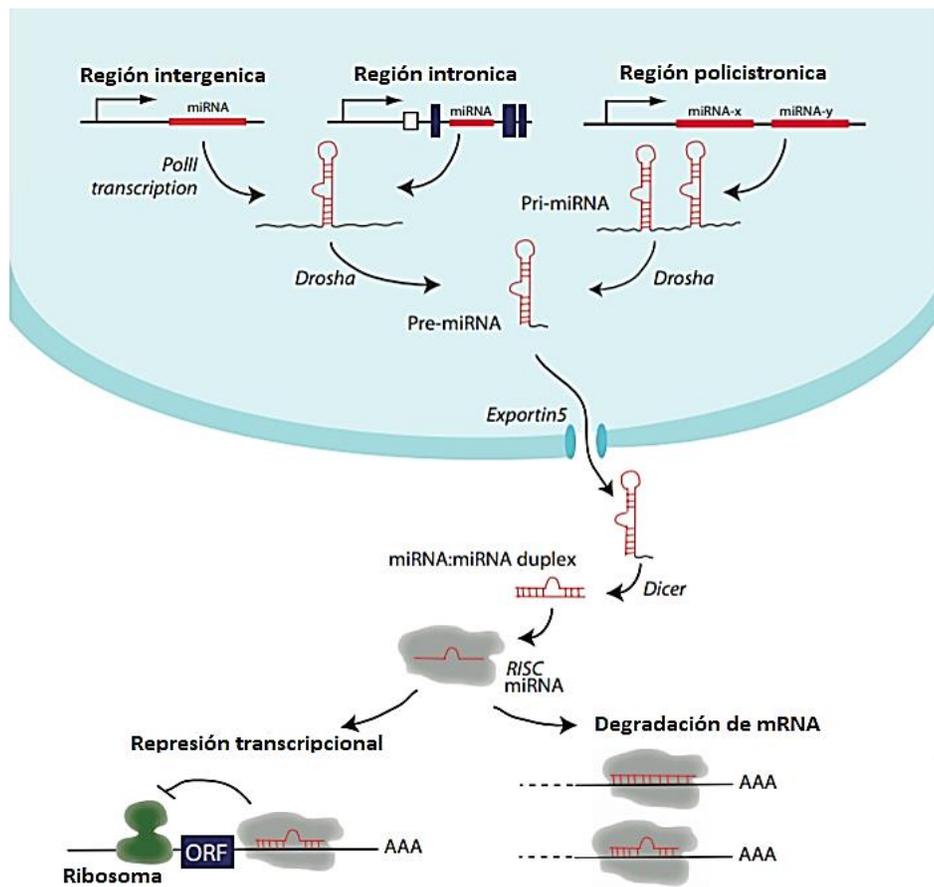


Figura 2. Biosíntesis de micro-RNA. Tomado de Kim, V., Han, J., Siomi, M. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 126-139.²³

Los micro-RNA no actúan exclusivamente en las células en las que han sido sintetizados, en los últimos años se han identificado diversos micro-RNA circulantes en varios fluidos del organismo. Se postula que estos micro-RNA son secretados y transportados a través de estos fluidos hasta células diana donde ejercen su función.²³

Considerando la enorme capacidad de los micro-RNA para influir sobre la expresión de gran parte del genoma y el complejo sistema de control en el que se encuentran inmersos, es comprensible que la desregulación de estos repercuta significativamente sobre la homeostasis del organismo. Un número creciente de micro-RNA ha sido implicado en distintas enfermedades cardiovasculares, permitiendo una mejor comprensión de la patogenia de las mismas.²⁴ Los micro-RNA regulan procesos importantes en humanos y uno de los procesos mejor conocido hasta ahora es la regulación del metabolismo lipídico y su influencia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

micro-RNA-let-7e

La familia let-7 contiene 13 miembros ubicados en el cromosoma 9; estos miembros son respectivamente let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i micro-RNA 98 y micro-RNA-202 y algunos de ellos están ubicados en el genoma como grupos. Por ejemplo, let-7a-1, let-7d y let-7f-1 forman el grupo intergénico asignado al cromosoma 9q22.32, mientras que let-7b y let-7a 3 forman el grupo intergénico asignado al cromosoma 22q13.31. ²⁵

Diferentes estudios han reportado la relación que existe entre la expresión aberrante de miembros let-7 en enfermedades cardiovasculares, como hipertrofia cardíaca, fibrosis cardíaca, miocardiopatía dilatada, infarto de miocardio, arritmia, angiogénesis, aterosclerosis e hipertensión. Let-7 también participa en la diferenciación cardiovascular de células madre embrionaria, regulando genes como *TLR4*, *LOX-1*, *Bcl-xl* y *AGO1*.²⁶ **Figura 3.**

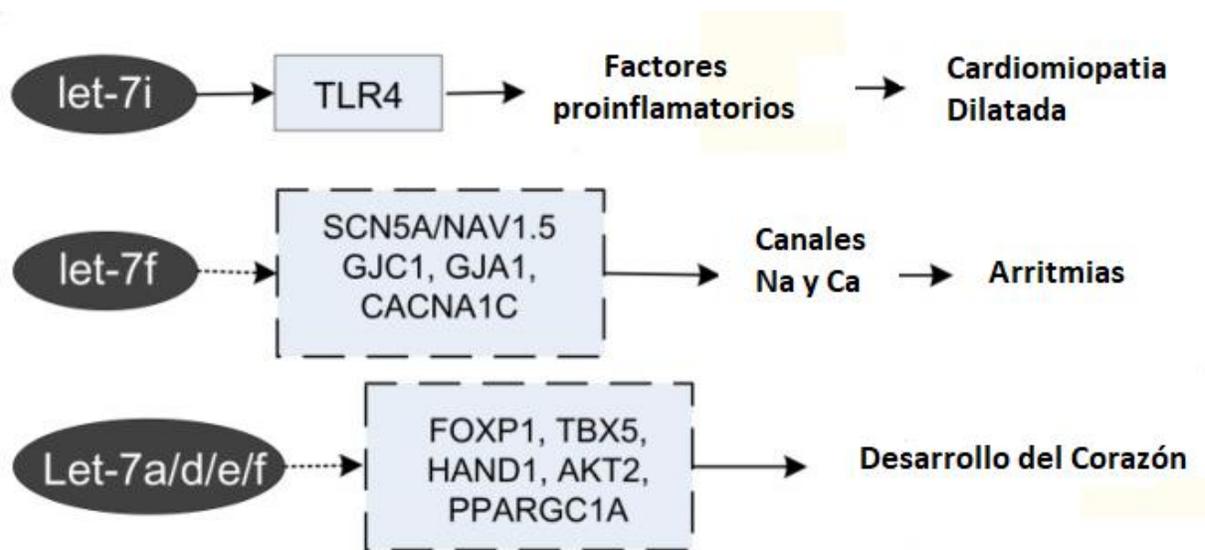


Figura 3. Rutas DE acción del let-7 y sus efectos clínicos

Se ha reportado la evaluación de los micro-RNA de la familia let-7, expresados diferencialmente en el plasma de pacientes con comunicación interventricular detectando la subexpresión del micro-RNA en plasma circulante de pacientes con comunicación intraventricular (CIV), pudiendo causar anomalías cardíacas al unirse con genes diana específicos del corazón.²⁷⁻²⁹

micro-RNA-17

Dentro de la familia micro-RNA-17-92, la eliminación dirigida revela funciones esenciales, demostrando que la eliminación de micro-RNA-17, conduce a la letalidad neonatal y defectos muy específicos en el desarrollo del corazón.²⁸⁻²⁹

Estudios recientes sobre el análisis funcional del grupo micro-RNA-17-92 han demostrado que participan en el control de la diferenciación del miocardio durante la embriogénesis de los mamíferos. Se han evidenciado en estudios *in vivo*, que la alteración de la expresión de este micro-RNA, puede inducir malformaciones cardíacas en los tractos de salida de los grandes vasos (conotruncales) y/o comunicaciones interventriculares en distintos modelos animales, probablemente a través de la represión de genes progenitores cardíacos clave, como *Isl1*, *Tbx1*, *Hoxb8* y *Hand16*.³⁰

micro-RNA-191

Trabajos recientes nos indican que la subexpresión de este micro-RNA está asociada con eventos recurrentes de infarto al miocardio y también sugiere que miR-191 refleja la activación de las plaquetas, lo que indica su papel potencial en los eventos trombóticos.³¹

De igual manera existen estudios que informan la expresión del microRNA-191 en el síndrome de hipoplasia del ventrículo izquierdo SHIV y CIV.³²⁻³³

Por lo anterior, la expresión de los micro-RNAs puede estar participando en el desarrollo del corazón desde etapas tempranas de la vida, y su expresión puede influir sobre otras proteínas reguladoras de la transcripción como *GATA4*, la cual se

expresa tanto en cardiomiocitos embrionarios como adultos, donde funciona como un regulador transcripcional de muchos genes cardíacos y también regula el crecimiento hipertrófico del corazón, promueve la morfogénesis cardíaca, la supervivencia de los cardiomiocitos y mantiene la función cardíaca en el corazón adulto.³⁴ Las mutaciones o defectos en el gen *GATA4* pueden conducir a una variedad de problemas cardíacos que incluyen enfermedad cardíaca congénita, plegamiento ventral anormal y defectos en el tabique cardíaco que separa las aurículas y los ventrículos e hipoplasia del miocardio ventricular.³⁵

Por otro lado, *NKX2-5*, es una proteína que en humanos es codificada por el gen *NKX-5*.³⁶ La expresión de *NKX2-5* es esencial para el desarrollo de la tabicación auricular, ventricular y conotruncal, la formación de la válvula auriculoventricular (AV) y el mantenimiento de la conducción AV. Las mutaciones en la expresión están asociadas con CC y dolencias relacionadas. Los pacientes con mutaciones en *NKX2-5* suelen presentar bloqueo de conducción auriculo-ventricular y comunicación interauricular.³⁶

Mientras que, la proteína 2 expresada en derivados del corazón y de la cresta neural es una proteína que en humanos está codificada por el gen *HAND2*.³⁷ Este producto génico es uno de los dos miembros de la familia estrechamente relacionados, las proteínas *HAND* (*Hand1* y *Hand2*), que se expresan asimétricamente en las cámaras ventriculares en desarrollo y desempeñan un papel esencial en la morfogénesis cardíaca. Trabajando de manera complementaria, actúan en la formación de las arterias del ventrículo derecho y del arco aórtico, lo que las implica como mediadoras de cardiopatías congénitas. Además, este factor de transcripción juega un papel

importante en el desarrollo de las extremidades y el arco branquial.³⁸ En un estudio, se encontró que una mutación sin sentido de la proteína Hand2 en pacientes con tetralogía de Fallot experimentó una disminución significativa de las interacciones de *Hand2* con otros genes clave del desarrollo, como *GATA4* y *NKX2-5*.^{15,39}

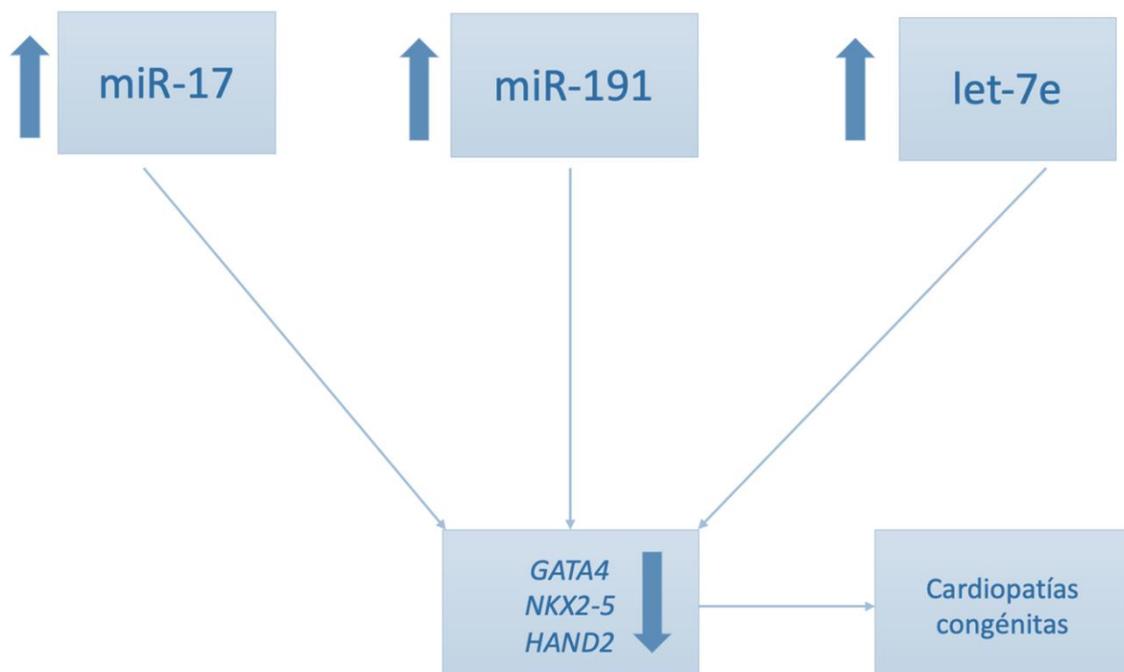


Figura 4. Micro-RNA de estudio y su concentración con sus genes blancos asociados a cardiopatías congénitas.^{15,39}

JUSTIFICACION

Las cardiopatías congénitas son los trastornos congénitos más comunes en el recién nacido, se estima una prevalencia de 8-10 por cada 1000, sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes que conllevan a estas alteraciones son poco conocidas. Recientemente se ha demostrado que los micro-RNA regulan post-transcripcionalmente la expresión de genes asociados a las cardiopatías congénitas. Por lo tanto, el estudio de estas especies moleculares y su interacción entre ellas mismas nos permitirá tener un mejor conocimiento sobre la fisiopatología de las CC en pacientes pediátricos, y de esta manera contribuir en el desarrollo de futuros biomarcadores que se han convertido en uno de los principales enfoques para el diagnóstico, desarrollo y pronóstico de enfermedades cardiovasculares.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la expresión de los micro-RNA let-7e, 17 y 191 y determinar su relación en cardiopatías congénitas en pacientes pediátricos del INCar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Se realizará la cuantificación en la expresión de los micro-RNA let-7e, 17 y 191 en dos grupos de estudio (CC y controles).
- ▶ Se analizarán las expresiones de los micro-RNAs estudiados entre los pacientes con CC divididos en presencia o ausencia de cianosis
- ▶ Se realizará la correlación entre las expresiones de los micro-RNAs estudiados y las variables clínicas

HIPÓTESIS

Los pacientes pediátricos con Cardiopatías Congénitas presentarán diferencias en la expresión de los micro-RNA en comparación con los sujetos control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de investigación

Observacional, transversal de casos y controles.

Población de estudio

Pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” Y del Instituto Nacional de Perinatología.

Proyecto de investigación Aprobado por el comité de investigación en su Sexta Sesión Ordinaria y por el comité de Ética en Investigación, con aprobación de los siguientes documentos; Propuesta de proyecto de investigación en español y consentimiento informado en español, con número de registro 20-1181 (**Anexos 01 y 02**)

Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$n = \left(\frac{z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right)^2$$

- donde: $p = \frac{p_1 + p_2}{2}$
- p_1 es la frecuencia de las CC aumentado entre los casos;
- p_2 es la frecuencia del CC aumentado entre los controles; y

- $z_{1-\alpha/2}$ y $z_{1-\beta}$ son los valores que se obtienen de la distribución normal estándar en función de la seguridad y la potencia seleccionadas para el estudio. En particular, para un nivel de seguridad de un 95 % y una potencia estadística del 80 %.

El tamaño total de la población según la fórmula es de 9 pacientes por grupo, sin embargo, se trabajó con 50 controles y 50 cardiopatas para aumentar el poder estadístico.

Tamaño de Muestra

50 pacientes pediátricos aparentemente sanos

50 pacientes pediátricos con Cardiopatías Congénitas.

Criterios de Selección

Criterios de inclusión

A) Grupo con Cardiopatías Congenitas (CC)

- Pacientes pediátricos con diagnóstico de CC realizado por un especialista.
- Pacientes pertenecientes al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
- Pacientes de ambos géneros con CC.
- Solo pacientes donde los tutores acepten y firmen la hoja de consentimiento informado

B) Grupo control

- Pacientes pediátricos sin antecedentes de CC obtenidos del INPer
- Pacientes con edad similar a los sujetos con CC
- Solo pacientes donde los tutores acepten y firmen la hoja de consentimiento informado

Criterios de exclusión

A) Grupo Cardiopatías Congénitas (CC)

- Presencia de alguna enfermedad congénita no cardiovascular
- Presencia de insuficiencia cardiaca congestiva.
- Presentar alguna enfermedad inflamatoria.
- Padecer alguna enfermedad crónico-degenerativa.
- No estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación

B) Grupo control

- Presencia de alguna enfermedad congénita cardiovascular
- Presencia de insuficiencia cardiaca congestiva.
- Presentar alguna enfermedad inflamatoria.
- Padecer alguna enfermedad crónico-degenerativa.
- No estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación

Variables Clínicas

Las variantes clínicas fueron recopiladas a través de un cuestionario previamente aprobado por el comité de ética del instituto (**Anexo 03**). En la siguiente tabla, se muestran todas las variables, así como, la definición, medición, indicador y escala de acuerdo con las cardiopatías congénitas.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
Clasificación clínica	Parámetros que suministran datos sobre la clase clínica, los síntomas, la etiología, las alteraciones anatómicas y los mecanismos fisiopatológicos que presenta un determinado paciente.	Los signos y síntomas de las CC dependen del tipo y de la gravedad del defecto en particular, partiendo desde afecciones simples que no causan síntomas hasta problemas complejos que causan síntomas graves y potencialmente mortales. Se clasifican en 2 grandes grupos, según la relación con la presencia de cianosis.	Cuantitativa continua	Cianógena y no cianógena

edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.	Días cumplidos al momento del estudio en función de la fecha de nacimiento.	Cuantitativa discreta	Horas, días, años
Sexo	Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres.	De acuerdo con el cuestionario previamente implementado.	Cualitativa nominal	Femenino Masculino

Tabla 2. Variables clínicas de los grupos de estudio

DISEÑO EXPERIMENTAL

Estrategias Metodológicas

Las muestras de sangre se obtendrán por punción venosa y recolectadas en tubos con ácido etilendiaminotetracético sódico (EDTA-Na). De dos tubos se llevará a cabo la separación de plasma mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 min. Para su posterior extracción de micro-RNA.

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo de muestras de plasma de los pacientes pediátricos utilizando el kit “miRNeasy Serum/Plasma Advance Kit” (Qiagen®). Durante el proceso de extracción se adiciono el control interno de micro-RNA sintético para una secuencia de *C. elegans* (cel-miR-39). (**Anexo 04**)

Transcripción reversa

Se realizó una retrotranscripción (RT-PCR) con 2µl de RNA total a una concentración 1 µg, para la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del kit “HighCapacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems). (**Anexo 05**)

La retrotranscripción de cada miRNA de estudio se llevó a cabo con 2µl de RNA total. Las condiciones de ciclaje fueron: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C, y 4 min a 4°C. (**Anexo 06**)

El cDNA se almacenó a -20°C.

Análisis de los micro-RNA y validación de la cuantificación

La expresión de los miR-17 (hsa-miR-17), miR-191 (hsa-miR-191), y let-7e (hsa-let-7e) en plasma, se cuantificó empleando ensayos TaqMan para microRNA utilizando el equipo de PCR CFX96-Touch Real Time System BioRad. Las condiciones de ciclaje fueron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C y 1min a 60°C. (**Anexo 07**)

Los micro-RNA se normalizarán con el gen endógeno miR-39. Se cuantificarán de forma relativa por medio de la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el programa SPSS versión 19 (SPSS Inc. Chicago USA). Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (DS). La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba t de Student para variables continuas. En el caso de las variables que no presenten una distribución normal, se llevó a cabo la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de regresión logística binaria con la construcción del modelo de acuerdo con las variables que resultaron de importancia. Finalmente, se realizó un análisis de correlación por medio de la prueba de Spearman. Los resultados con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Descripción de la población

Se analizó una población de 100 sujetos pediátricos mexicanos en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y del Instituto Nacional de Perinatología, que cumplieron todos los criterios de inclusión, previamente establecidos, 50 sujetos correspondieron a pacientes con algún tipo de cardiomiopatía congénita obtenidos del INCar y 50 pacientes sin cardiopatía congénita detectada al nacimiento, que correspondieron al grupo control, provenientes del INPer.

La **Tabla 3** muestra las principales características clínicas y antropométricas de los grupos de estudio. En el grupo cardiópata se estratificó en pacientes cianógenos y no cianógenos, donde se observó una prevalencia del 80% y 20% respectivamente. En cuanto a la edad de los sujetos de estudio, los pacientes cardiopatas tuvieron una prevalencia de edad 0-2 años (48%), 2-11 años (40%), y 12-17 años (12%); mientras que los sujetos control el 100% de los casos fueron dentro del primer año de edad.

Muestra	Controles			Cardiópatas	
	total	n	%	n	%
Muestra	100	50	100	50	100
Sexo	hombres	20	40	30	60
	mujeres	30	60	20	40
Cianógenos	Sí	0	0	40	80
	No	50	100	10	20
Grupo de edad	0-2 años	50	100	24	48
	2-11 años	-	-	20	40
	12-17 años	-	-	6	12

Tabla 3. Características clínicas y antropométricas de los pacientes.

Expresión de micro-RNA

Se determinó la expresión de micro-RNA -let7e-5p, micro-RNA -17p y micro-RNA -191, en ambos grupos de estudio, mediante la técnica de PCR en tiempo real. Se encontró que de los tres micro-RNA evaluados, solo micro-RNA-17 presentó una significancia estadística; con un aumento en la expresión relativa en el grupo CC con respecto al grupo control (Grupo CC: mediana 6.92 min; 0.13 – máx; 741.98 vs Grupo control: mediana 33.97 min; 0.74 – máx; 8024.68 $p=0.003$)(**Tabla 4**).

Tabla 4. Expresión de micro-RNA estudiados

Características (n=100)	Grupo CC (n=50)	Grupo Control (n=50)	P
	% (IC95%)	% (IC95%)	
Micro-RNA-Let-7e	46.47 (0.19-5546.37)	39.27 (0.34-3814.63)	0.831
Micro-RNA-17	33.97 (0.74-8024.68)	6.92 (0.13-741.98)	<0.003*
Micro-RNA-191	19.97 (0.16-6560.67)	8.38 (0.13-2609.63)	0.056

Los valores se expresan como mediana (min-máx.) * $P<0.05$

Posteriormente, con el propósito de analizar la expresión en los micro-RNA y conocer si esta clasificación presenta cambios en la expresión entre el grupo de pacientes con cardiopatías, se clasificaron de acuerdo con la presencia o no de cianosis.

En el caso del micro-RNA-let-7e se encontró una sobreexpresión en los pacientes cardiopatas no cianóticos (mediana 187 (min; 0.61 – máx; 4262.04) en comparación con los sujetos del grupo control (mediana 39.27 (min; 0.34 – máx; 3841.63) $p=0.015$) y los cardiopatas cianóticos (mediana 22.98 (min; 0.19 – máx; 5546.37) $p=0.033$).

Figura 5 (A).

Para el micro-RNA-17 se observó una sobreexpresión en los pacientes cardiopatas no cianóticos (mediana 68.84 (min; 0.80 – máx; 4673.31) con respecto a los sujetos del grupo control (mediana 6.92 (min; 0.13 – máx; 741.98) $p=0.020$) y de igual forma, un aumento de expresión en el grupo de los cardiopatas cianóticos (mediana 17.69 (min; 0.74 – máx; 8024.68) versus grupo control (mediana 6.92 (min; 0.13 – máx.; 741.98) $p=0.011$), estos datos se pueden visualizar en la **Figura 5 (B)**.

Con respecto a miRNA-191, es evidente el aumento de la expresión en los pacientes cardiopatas no cianóticos (mediana 70.21 (min; 0.50 – máx; 5237.37) en comparación con los pacientes del grupo control (mediana 8.38 (min; 0.13 – máx; 2609.63) $p=0.020$) del mismo modo esta de manifiesto la sobre expresión de los cardiopatas no cianóticos, con respecto al grupo control –(mediana 8.38 (min; 0.13 – máx; 2609.63) $p=0.011$).**Figura 5 (C)**.

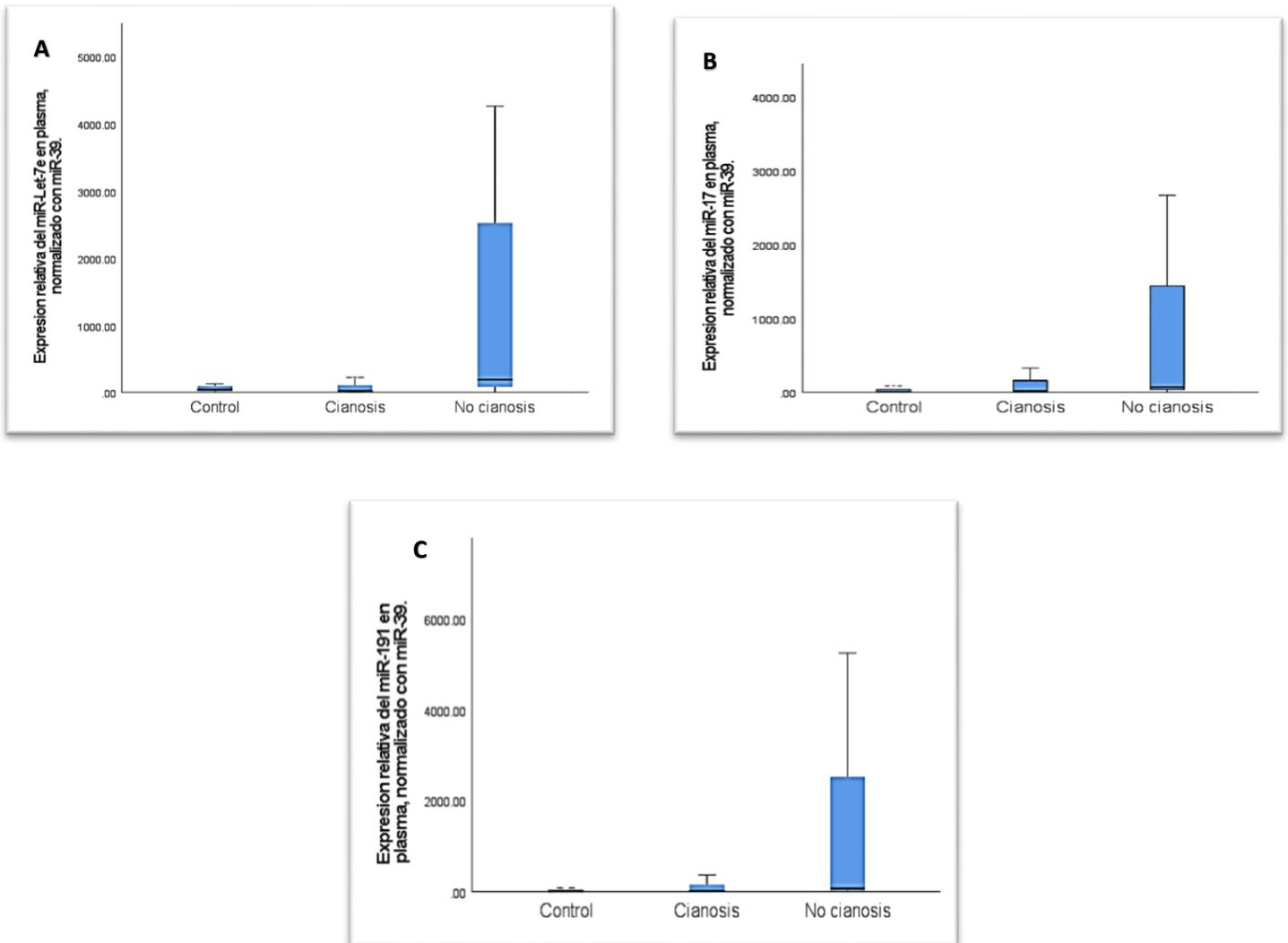


Figura 5. **A)** Expresión del miR-Let-7e en plasma del grupo control en comparación a la clasificación clínica cianótico y no cianóticos. **B)** Expresión del miR-17 en plasma del grupo control en comparación a la clasificación clínica cianótico y no cianóticos. **C)** Expresión del miR-191 en plasma del grupo control en comparación a la clasificación clínica cianótico y no cianóticos. Los datos fueron normalizados con el miR-39. Los datos expresan la mediana (mín-máx), * $p < 0.05$.

Finalmente, se estratificó por grupos de edades, con la finalidad de evaluar la aparición y permanencia de la expresión en los micro-RNA ya descritos. Se evidenció una

disminución paulatina de la expresión acorde al aumento de edad; presentando una significancia estadística.

En el caso del micro-RNA-let-7e se encontró una disminución progresiva de acuerdo con la edad, es decir, en niños de 2 a 11 años hubo una disminución en la expresión de let-7e del 75%, mientras que en niños de 12 a 17 años fue del 97.5%. **Figura 6(A)** De la misma manera, encontramos un cambio para el micro-RNA-191. Observamos la disminución gradual de la expresión acorde al aumento de la edad de los pacientes no cianóticos, en niños de 2 a 11 años del 45%, y en niños de 2 a 17 años fue del 98%.

Figura 6(B).

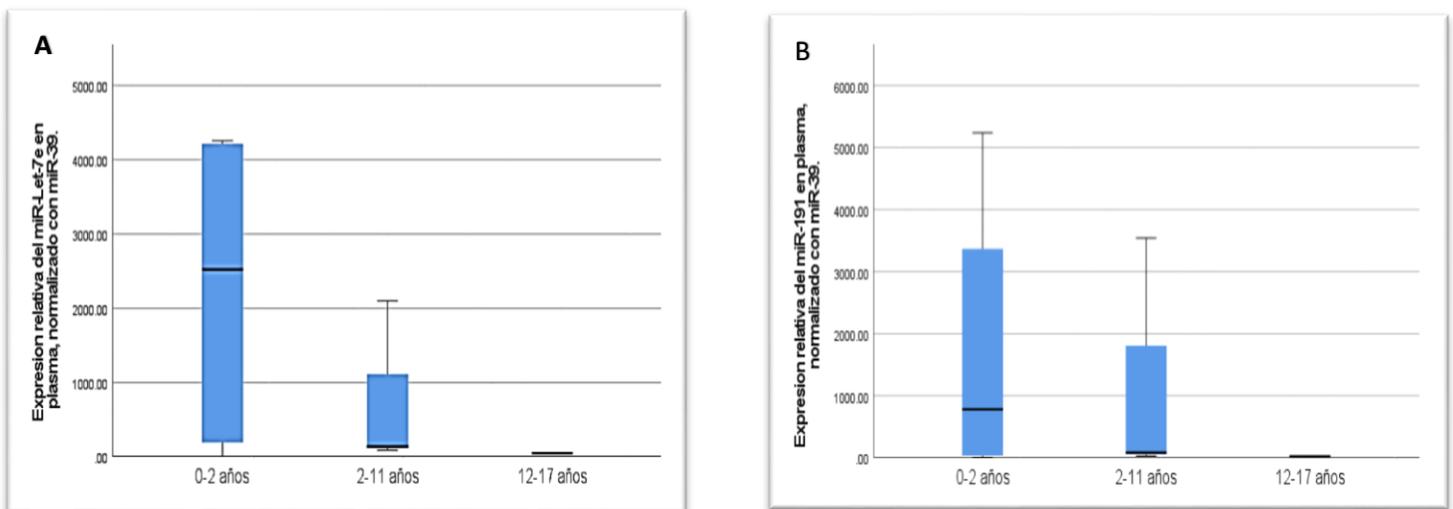


Figura 6. A) Expresión del miR-Let-7e en plasma del grupo control de acuerdo a los grupos de edad (no cianógenos). **B)** Expresión del miR-17 en plasma del grupo control de acuerdo con los grupos de edad (no cianógenos). Los datos fueron normalizados con el miRNA-39. Los datos expresan la mediana (mín-máx), * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Las cardiopatías congénitas son malformaciones en la estructura del corazón que ocurren durante el proceso de la cardiogénesis, es decir, defectos que ocurren en el feto mientras se desarrolla en el útero durante el embarazo.²⁹⁻³⁰ La cardiogénesis es el proceso estrictamente regulado donde interactúan diversas vías de señalización y factores de transcripción específicos para la diferenciación y especialización celular en la formación del órgano y sus anexos.⁴⁰ Estos procesos son regulados, a su vez por mecanismos epigenéticos como los microRNAs, los cuales han sido identificados como moléculas claves en la diferenciación y morfogénesis cardíaca.³⁹ La expresión anómala de ciertos miRNAs tienen un papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.⁴¹

En el presente trabajo, se analizaron 50 pacientes con CC y se compararon con 50 pacientes sin CC los cuales fueron considerados como sujetos controles. Ambos grupos fueron evaluados al momento del nacimiento. Nuestros resultados muestran que nuestra población con CC tuvo una prevalencia 20% no cianóticos, y 80% cianóticos; sin embargo, estos datos no concuerda con diferentes estudios previos, en donde se han reportado que las CC no cianóticas al ser asintomáticas, presentan un diagnóstico tardío y en muchos de los casos no ameritan procedimientos mayores, en comparación con las CC cianóticas.⁶ Esto podría deberse al tipo de población, el cual la carga genética puede diferir, sin embargo, un problema mayor es la detección temprana y efectiva del tipo de CC. Se conoce que los métodos de detección pueden variar en las diferentes dependencias, ya sea por la experiencia en la parte médica y

en los recursos en los equipos de imagen para poder detectarlas de manera temprana y eficaz.

Posteriormente, se realizó una estratificación por grupos de edad de nuestros pacientes CC y encontramos que la mayor frecuencia se encontró en edades neonatales y lactantes, en contraste la menor frecuencia fue en pacientes preadolescentes, existen diversos trabajos que reportan que cuando se elimina la circulación materna y el sistema del recién nacido se hace independiente, se manifiesta el trastorno anatómico que en muchos casos los desenlaces pueden ir desde trastornos que solo pueden ser corregidos por cirugía hasta letalidad en edades neonatales y lactantes.³¹

El incremento de las CC en los últimos años y la relevancia que ha alcanzado a nivel mundial y en México, ha propiciado la búsqueda de nuevas estrategias, apoyándose en la biología molecular. Existen diferentes reportes acerca de la asociación entre los micro-RNA y las CC.³²⁻³³

Al analizar los datos de expresión de los micro-RNA de estudio, solo encontramos que la expresión del micro-RNA -17 muestra un aumento significativo en el grupo CC en comparación con el grupo de pacientes sanos. Existen estudios donde se ha reportado que este micro-RNA se encuentra subexpresado en modelo murinos,²⁷ por otro lado, se conoce que la eliminación dirigida de este micro-RNA aumenta la letalidad neonatal y defectos que resultan muy específicos en el desarrollo del corazón. Sin embargo, en nuestros resultados encontramos datos contradictorios a lo reportado previamente, lo cual no concuerda con nuestros datos reportados. Esto podría deberse a que los

reportes previos se han realizado en modelos murinos y líneas celulares, en donde las variables se encuentran controladas, mientras que nuestro estudio se basó en expresión genética en pacientes humanos,³⁰ y que podría haber otros factores como los maternos que podrían modificar su expresión. Se conocen que algunos factores maternos como la edad, número de embarazos, fumar, beber, ingesta de drogas, medio ambiente, entre otros, podrían estar influenciando la expresión de los micro-RNA y como consecuencia, la aparición de este tipo de enfermedades congénitas.

Posteriormente, se realizó una estratificación de nuestro grupo de estudio CC, en 2 subgrupos (cianosis y no cianosis). Al comparar los niveles de expresión de este micro-RNA encontramos que existe una disminución en la expresión del micro-RNA-17 en pacientes cianóticos vs pacientes sanos y pacientes no cianóticos.⁴²

Existen reportes en modelos murinos donde la delección de micro-RNA-17, conduce a malformaciones cardíacas.³⁰⁻³¹ Se demostró que al comparar roedores con el gen mutado (*HOXA-1* y *HOXA-4*) versus roedores con el gen silvestre (wild-type), presentaron corazones con un tamaño similar, sin embargo, los roedores mutantes presentaban un defecto septal ventricular (CIV) claro, el cual puede ser clasificado como CC cianótica.²⁷ Un posible mecanismo de acción podría ser que el microRNA-17 tiene como gen blanco a *HOXA-1* y *HOXA-4*; la sobreexpresión de este microRNA podría estar silenciando la expresión de estos genes blanco durante el proceso cardíaco embriogénico, para poder corroborar esta idea sería necesario, cuantificar el RNA y la proteína, sin embargo, una de las limitantes, es que estos genes se

expresan en tejidos específicos, es decir en tejido cardíaco, por lo tanto la obtención de biopsias es objetivo de un trabajo futuro.⁴³

Un posible mecanismo molecular por el cual, el miR-17 se encuentra asociado a las CC cianóticas, sería la ausencia de este micro-RNA, lo que permite la sobreexpresión de genes progenitores cardíacos, tales como *Isl1* (ISL LIM homeobox 1) y *Tbx1* (T-box 1), lo que afecta las cascadas de señalización del segundo campo cardíaco que se requiere para la formación adecuada del tracto de salida.³⁴ Sin embargo, nuestros resultados, mostraron un aumento significativo en los primeros meses de vida, lo cual no concuerda con lo reportado. Nuevamente, podríamos especular que las características clínicas y hábitos maternos podrían estar influyendo en estos resultados, por lo cual se propone realizar este análisis posteriormente.

En el caso de los miR-let7e y miR-191 se realizó la misma estratificación de pacientes con CC en cianosis y no cianosis. En el primero de los micro-RNA observamos que al comparar los valores de expresión entre los grupos de estudio encontramos que existe una sobreexpresión del miR-let7e en pacientes no cianóticos en comparación con el grupo control y el grupo CC cianótico. Lo cual concuerda con Li y colaboradores (2014) en donde en pacientes con comunicación interventricular (CIV) encontraron que el miR-let7e se presenta una disminución en la expresión.²⁹

Además, existen estudios *in vivo* e *in vitro* han revelado que la expresión aberrante de let-7 se asocia a diversas enfermedades cardiovasculares, desarrollo del corazón y diferenciación cardiovascular, lo que implica que pueden desempeñar un papel importante en estos procesos. Cabe señalar que las tendencias de expresión de

miembros específicos de let-7 son específicas de la enfermedad y del órgano. Hasta ahora, solo se han descubierto algunos genes blanco para let-7, como *TLR4*, *lox-1*, *Bcl-xl*, *AGO1* y *GATA4*. Las mutaciones o defectos en los genes blanco como en el gen *GATA4* pueden conducir a una variedad de problemas cardíacos que incluyen enfermedad cardíaca congénita, plegamiento ventral anormal y defectos en el tabique cardíaco que separa las aurículas y los ventrículos e hipoplasia del miocardio ventricular.³⁵

Es fundamental identificar sus genes blancos y las vías de señalización responsables de sus efectos cardiovasculares en estudios futuros. Además, actualmente no está claro cómo se regulan las expresiones de let-7e en las en el desarrollo del corazón .⁴⁵

Esto indica que hsa-let-7e puede desempeñar un papel regulador en el desarrollo de CIV. Por otro lado, se ha reportado que la sobreexpresión de este micro-RNA se ha asociado con transposición de las grandes arterias: las dos arterias principales (la aorta y la arteria pulmonar) que transportan la sangre desde el corazón se intercambian (transponen).^{9,46}

En el caso del miR-191, se encontró que se expresó diferencialmente en los dos grupos estudiados con respecto al grupo de sujetos sanos, manifestando la sobre expresión de los cardiópatas con respecto al grupo control.

El mayor porcentaje descrito de CC no cianóticos relacionados al miR-191 estaría ligado a la alta prevalencia de este tipo de CC en paciente pediátricos particularmente

al CIV y sus múltiples variantes acianóticas, reconociéndolo como los defectos cardíacos congénitos más comunes.³⁵

Es importante mencionar que no existe mucha información sobre este micro-RNA en patologías cardíacas, sin embargo, existen estudios recientes que arrojan información sobre el vínculo de expresión que existe entre el miR-191 y las CC, en particular la CIV y SHVI.^{25,26,36}

Existen evidencias que el miR-191 tiene como gen blanco a LBH el cual destaca en la expresión en el desarrollo de las extremidades y la formación del corazón en los embriones tempranos. Estudios en ratones knockout para el gen LBH, han mostrado que está implicado en sus funciones en la cardiopatía congénita humana y el cáncer de mama.³⁷ Los estudios sobre la expresión de estos micro-RNA son escasos, por lo que la sobreexpresión en pacientes cardiopatas no cianóticos y una menor expresión en pacientes cianóticos podrían decirnos que los mecanismos moleculares de desarrollo de malformaciones cardíacas pueden tener rutas moleculares independientes.

Por último, la expresión de los miR-let-7e y 191 en pacientes con CC no cianótica disminuye a medida que las edades de los pacientes van aumentando, esto nos permitiría evaluar los mecanismos moleculares que relacionan a estos genes para diagnóstico, desarrollo y pronóstico de la enfermedad en diferentes estadios del desarrollo a lo largo de la vida de los pacientes afectados.

Entendiendo que las cardiopatías congénitas tienen manifestaciones variadas dependiendo de la edad de presentación;³⁸ se proponen perfiles de marcadores que permitan anticipar dificultades en padecimientos clínicos graves de nueva aparición, asociando la sobreexpresión a una desregulación génica anómala ligada al desarrollo cardiaco y así poder dirigir el tratamiento hacia un pronóstico favorable.³⁹

Muchos niños con defectos cardíacos congénitos simples y complejos ahora pueden sobrevivir hasta la edad adulta y representan una población en expansión. La mayoría de ellos no se "curan" y necesitan un seguimiento especializado. La cirugía cardiovascular pediátrica es un elemento central en el tratamiento de las CC, traducido en la mejoría de los resultados en la etapa infantil, permitiendo a estos pacientes llegar a la edad adulta.⁴⁰⁻⁴¹ Por tanto, la estratificación que se realizó nos permite suponer que los micro-RNA de estudio refieren su comportamiento debido a que es un grupo muy heterogéneo en cuanto a su patología y deja en claro que la sub expresión también podrían estar relacionada a procedimientos quirúrgicos en la primera infancia o cierres espontáneos de comunicaciones simples del corazón.

Las cardiopatías asintomáticas son potencialmente progresivas y deberán llevar un seguimiento más estricto por el cardiólogo pediátrico, ya que en la mayoría de los casos es necesaria cirugía o cateterismo intervencionista en la primera infancia.⁴² Debido a esto, es importante mencionar que la cirugía al ser piedra angular en la corrección de los defectos cardiacos, deberá brindar la seguridad al pronóstico favorable; por tanto, se expone plantear como biomarcadores a estos micro-RNA para uso clínicos de una amplia gama de estados médicos, dado que nuestros resultados

tienen una distribución que se evidencian puntos importantes de partida para relacionar la expresión de los genes, su distribución durante diversos estadios marcados por la edad y la presencia de procedimientos mayores; traducido a la asociación de genes como marcadores pre y post operatorios determinando el momento idóneo para la intervención. Se toma como referencia, estudios que describen el nivel miR-208a preoperatorio como un biomarcador confiable para la predicción de pacientes que están en riesgo de desarrollar complicaciones postoperatorias.^{46,47,48}

CONCLUSIÓN

De los tres micro-RNA de estudio, solo el microRNA-17 presento una sobre expresión en los pacientes con CC en comparación con los pacientes controles.

Al clasificarlos clínicamente (cianóticos y no cianóticos) los tres micro-RNA estudiados aumentaron su expresión significativamente en el grupo no cianótico en comparación con el grupo control.

En cuanto a la estratificación por edades, se registró una disminución paulatina de la expresión de los microRNA-let-7e y microRNA-191 esto a medida que avanza la edad.

Se ha demostrado que el nivel de expresión de los microRNA-let-7, microRNA-17 y microRNA-191 en plasma puede estar relacionada a la aparición de cardiopatías congénitas.

PROSPECTIVAS

En este trabajo se presentó el análisis de expresión y relación de los microRNA-let-7e, microRNA-17, y microRNA-191 en pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas en plasma. Los alcances de este proyecto no se limitan a estos resultados, puesto que las cardiopatías congénitas son una enfermedad crónica que constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a sus patologías, por lo que se plantean las siguientes prospectivas.

- Analizar la expresión de los micro-RNA y sus genes blancos en pacientes con CC a partir de la saturación de oxígeno en pacientes acianóticos.
- Analizar la expresión de los micro-RNA y sus genes blancos de forma individualizada, es decir paciente por paciente a medida que transcurre los años, además de asociar el tratamiento recibido en el desarrollo de las cardiopatías congénitas.
- Determinar la participación de nuevas especies moleculares tales como los RNA circulares (circRNA) en la fisiopatología de las CC, así como su relación con los micro-RNA.
- Realizar la correlación entre la expresión de los micro-RNA con las variables clínicas maternas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pulignani, S. y Grazia, M. 2019. MicroRNAs and Congenital Heart Disease: Where Are We Now? *Rev Esp Cardiol.* 72(1):7–9.
2. Van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:2241–2247. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.025.
3. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1890–1900.
4. Wren C. The epidemiology of cardiovascular malformations. In: Moller JH, ed. *Pediatric Cardiovascular Medicine.* 2nd ed. West Sussex, UK: Blackwell Publishing; 2012: 268–275.
5. Marelli AJ, Ionescu-Ittu R, Mackie AS, Guo L, Dendukuri N, Kaouache M. Lifetime prevalence of congenital heart disease in the general population from 2000 to 2010. *Circulation.* 2014;130:749–756. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008396.
6. Márquez-González, H., Yáñez-Gutiérrez, L., Rivera-May, J., López-Gallegos, D. y Almeida-Gutiérrez, E. 2017. Demographic analysis of a congenital heart disease clinic of the Mexican Institute of Social Security, with special interest in the adult. *Arch Cardiol Mex.* 2018;88(5):360-368.
7. INdEyG. Mortalidad. Estadísticas de Mortalidad. 2021. [consultado 19 oct. 2022]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021_07.pdf
8. Carretero, M., & del Rosario, M. (2022). Detección, despistaje e intervención de alteraciones del neurodesarrollo de menores con cardiopatías congénitas al nacimiento.

9. Perich, M. 2012. Cardiopatías congénitas más frecuentes y seguimiento en Atención Primaria. *Pediatr. Integral*.16(8): 622-635.
10. Nagy, O., Baráth, S., & Ujfalusi, A. (2019). The role of microRNAs in congenital heart disease. *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 30(2), 165–178.
11. Lopez, L., Steven, D. y Colan, P. 2010 Guidelines and standards recommendations for quantification methods during the performance of a pediatric echocardiogram. *J Am Soc Echocardiogr*. 23:465-495.
12. Suluba, E., Shuwei, L., Xia, Q., & Mwanga, A. (2020). Congenital heart diseases: genetics, non-inherited risk factors, and signaling pathways. In *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* (Vol. 21, Issue 1, pp. 1–12).
13. Solano-Fiesco, L., Aparicio-Osorio, M. y Romero-Ramirez, J. 2015. Prevalencia e incidencia de cardiopatías congénitas en el Servicio de Cardiología Pediátrica del Hospital Central Militar; enero 2006-enero 2010. *Rev. Sanid. Milit. Mex*. 69:171-178.
14. Gu, H., Chen, L., Xue, J., Huang, T., Wei, X., Liu, D., Ma, W., Cao, S., & Yuan, Z. (2019). Expression profile of maternal circulating microRNAs as non-invasive biomarkers for prenatal diagnosis of congenital heart defects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 823–830. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.110>.
15. Li, X., Wu, L. y Gu, K. 2016 Peptidomic analysis of amniotic fluid for identification of putative bioactive peptides in ventricular septal defect. *Cell PhysiolBiochem*. 38(5):1999-2014.
16. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
17. Gonzalo-Calvo, D., Iglesias-Gutiérrez, E. y Llorente-Cortes, V. 2017. Epigenetic biomarkers and cardiovascular disease: circulating microRNAs. *Rev. Esp. Cardiol*. 70(9): 763-769.

18. Bhaskran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol*, 23(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
19. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. y Diederichs, S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.*11(3):228-34.
20. Lee, Y., Ahn, C. y Han, J. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956): 415-419.
21. Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. y Hannon J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409(6818):363-366.
22. Chendrimada, T., Gregory, R. y Kumaraswamy E. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436(7051): 740-744.
23. Kim, V., Han, J., y Siomi, M. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 126-139.
24. Inui, M., Martello, G. y Piccolo, S. 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11(4): 252-263.
25. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 2008 Oct;18(10):505-16. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.007. Epub 2008 Sep 4. PMID: 18774294.
26. Bao MH, Feng X, Zhang YW, Lou XY, Cheng Y, Zhou HH. Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int J Mol Sci.* 2013 Nov 21;14(11):23086-102. doi: 10.3390/ijms141123086. PMID: 24284400; PMCID: PMC3856107.
27. Angulo, M., Lecuona, E. y Lasha, J. 2012. Role of MicroRNAs in lung disease. *Arch. Bronconeumol.* 48(9): 305-346.
28. Dueñas, A.; Aranega, A.E.; Franco, D. More than Just a Simple Cardiac Envelope; Cellular Contributions of the Epicardium. *Front. Cell Dev. Biol.* 2017, 5, 44.

29. Li, D.; Ji, L.; Liu, L.; Liu, Y.; Hou, H.; Yu, K.; Sun, Q.; Zhao, Z. Characterization of circulating microRNA expression in patients with a ventricular septal defect. *PLOS ONE* 2014, 9, e106318.
30. Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S. J., Newman, J., Bronson, R. T., Crowley, D., Stone, J. R., Jaenisch, R., Sharp, P. A., & Jacks, T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132(5), 875–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.019>.
31. Hoelscher, S. C., Doppler, S. A., Dreßen, M., Lahm, H., Lange, R., & Krane, M. (2017). MicroRNAs: pleiotropic players in congenital heart disease and regeneration. *Journal of thoracic disease*, 9(Suppl 1), S64–S81. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.149>
32. Dueñas, A., Expósito, A., Aranega, A., & Franco, D. (2019). The Role of Non-Coding RNA in Congenital Heart Diseases. *Journal of cardiovascular development and disease*, 6(2), 15. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020015>.
33. Perrino C, Rockman HA. GATA4 and the two sides of gene expression reprogramming. *Circ Res*. 2006 Mar 31;98(6):715-6. doi: 10.1161/01.RES.0000217593.07196.af. PMID: 16574910.
34. Sun, R., Liu, M., Lu, L., Zheng, Y., & Zhang, P. (2015). Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell biochemistry and biophysics*, 72(3), 857–860. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0551-6>
35. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:253-77. doi: 10.1016/B978-0-12-387786-4.00008-7. PMID: 22449847; PMCID: PMC3684448.
36. Shiojima I, Komuro I, Inazawa J, Nakahori Y, Matsushita I, Abe T, Nagai R, Yazaki Y. Assignment of cardiac homeobox gene CSX to human chromosome 5q34. *Genomics*. 1995 May 1;27(1):204-6. doi: 10.1006/geno.1995.1027. PMID: 7665173.

37. Russell MW, Kemp P, Wang L, Brody LC, Izumo S. Molecular cloning of the human HAND2 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 22;1443(3):393-9. doi: 10.1016/s0167-4781(98)00237-1. PMID: 9878849.
38. Bruna Duarte Rengel, Thayne Woycinck Kowalski, João Matheus Bremm, Julia do Amaral Gomes, Lavínia Schüler-Faccini, Fernanda Sales Luiz Vianna, Lucas Rosa Fraga. Genetic evaluation of HAND2 gene and its effects on thalidomide embryopathy. *Birth Defects Res* 2022; 114(20):1354-1363
39. Li C, Wang Y, Luan H, Zhang H, Xu Y. Bioinformatics analysis in menopause transition promotes distinct modulation in calvaria and bone marrow osteoblastic cells. *Cell Biol Int*. 2018 Jan;42(1):10-11. doi: 10.1002/cbin.10823. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28737222.
40. Muñoz-Chápuli R, Pérez-Pomares JM. Cardiogenesis: an embryological perspective. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010 Feb;3(1):37-48. doi: 10.1007/s12265-009-9146-1. Epub 2009 Nov 4. PMID: 20560033.
41. Kalayinia S, Arjmand F, Maleki M, Malakootian M, Singh CP. MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease. *Cardiovasc Pathol*. 2021 Jan-Feb;50:107296. doi: 10.1016/j.carpath.2020.107296. Epub 2020 Oct 3. PMID: 33022373.
42. Kong, D., Li, H., Ren, C., Yang, W., & Zhang, Z. (2021). MicroRNAs in Fetal Umbilical Cord Blood as a Prenatal Screening Tool for Congenital Heart Disease. *Annals of clinical and laboratory science*, 51(5), 705–712.
43. Gu, H., Chen, L., Xue, J., Huang, T., Wei, X., Liu, D., Ma, W., Cao, S., & Yuan, Z. (2019). Expression profile of maternal circulating microRNAs as non-invasive biomarkers for prenatal diagnosis of congenital heart defects. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 823–830. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.110>
44. Wang, J., Greene, S. B., Bonilla-Claudio, M., Tao, Y., Zhang, J., Bai, Y., Huang, Z., Black, B. L., Wang, F., & Martin, J. F. (2010). Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNA-

- mediated mechanism. *Developmental cell*, 19(6), 903–912.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.022>
45. Radhakrishna, U., Albayrak, S., Zafra, R., Baraa, A., Vishweswaraiah, S., Veerappa, A. M., Mahishi, D., Saiyed, N., Mishra, N. K., Guda, C., Ali-Fehmi, R., & Bahado-Singh, R. O. (2019). Placental epigenetics for evaluation of fetal congenital heart defects: Ventricular Septal Defect (VSD). *PloS one*, 14(3), e0200229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200229>
46. Wentian Wang, Yang Yang, Yongjuan Duan, Huijuan Zhao, Xiao Hu; Limb-Bud and Heart (LBH), Target of Mir-191, Is a Novel Positive Regulator of Erythroid Differentiation. *Blood* 2016; 128 (22): 1199. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.1199.1199>
47. Kannan B. R. (2020). Clinical Diagnostic Approach to Congenital Acyanotic Congenital Heart Disease in Infants and Children. *Indian journal of pediatrics*, 87(5), 381–384. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03251-w>
48. Sarria-García, E., Navarrete-Espinosa, I., Vera-Puente, F., Cano-Nieto, J., Ruiz-Alonso, E., & Calleja-Rosas, F. (2022). Pronóstico de los Pacientes con cardiopatías congénitas del adulto intervenidos quirúrgicamente. análisis de resultados y factores asociados a reingreso Hospitalario y mortalidad. *Cirugía Cardiovascular*. <https://doi.org/10.1016/j.circv.2022.08.004>

Anexo 01

Carta de aceptación por el comité de ética del INCar.

 **SALUD**
SECRETARÍA DE SALUD

 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

INCAR-DG-DI-CI-241-2020

Dictamen del Comité de Investigación

No. de protocolo en el INCar:	20-1181
Nombre del estudio:	Estudio de los microRNA's y RNA's circulares y su asociación con la enfermedad congénita cardíaca en pacientes pediátricos.
Número del estudio:	---
Patrocinador Externo (si aplica):	---
Sitio donde se realizará el estudio:	Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Domicilio del sitio donde se realizará el estudio:	Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, C.P. 14080, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México

Ciudad de México, a 22 de octubre de 2020.

Dr. Ricardo Gamboa Ávila
Departamento de Fisiología
Investigador Responsable del Proyecto
Presente.

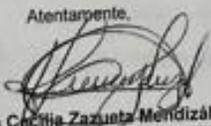
Dr. Gamboa:

Le informamos que los documentos que se mencionan a continuación han sido revisados y aprobados por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, hoy en su Sexta Sesión Ordinaria.

1. Propuesta de proyecto de investigación, en español.
2. Consentimiento Informado, en español.

Esta aprobación, tiene vigencia hasta el 22 de octubre de 2021. En caso de requerir una ampliación, deberá enviar al Comité un reporte de progreso, al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia y así evitar la suspensión de su protocolo.

El Comité de Investigación no sella ningún documento, sólo emite dictamen.

Atentamente,

Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal
Presidenta del Comité de Investigación.

c.c.p. Expediente
ACZMehg

Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14080,
Ciudad de México
Tel.: 555573-2911 ext. 24202, 24203 |

Anexo 02

Consentimiento informado.

**SALUD**
SECRETARÍA DE SALUD

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ"

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El que suscribe Sr. (a) _____
Padre () Madre (), responsable legal del menor _____

APROBADO
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

Protocolo 20-1181
Aprobado
Unanimidad
Mayoría
Fecha 29-Oct-2020

No. Expediente/ De registro hospitalario _____
Teléfono casa: _____ cel. _____

Por medio de la presente doy mi consentimiento para participar de manera voluntaria y sin percepción económica alguna, en el protocolo de investigación intitulado "Estudio de los microRNA's y RNA's circulares y su asociación con la enfermedad congénita cardiaca en pacientes pediátricos".
Por lo cual acepto donar una muestra de sangre y/u orina y/o saliva para la obtención de material genético sin costo alguno. Entiendo que los datos generados, así como el nombre(s) del (los) participante(s) son totalmente confidenciales y anónimos. Los datos generados serán utilizados únicamente con fines de investigación para entender y conocer mejor la enfermedad.

Se me ha explicado la importancia y utilidad de la investigación, así mismo he comprendido las explicaciones las cuales se me han dado de manera clara y sencilla, y que el médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE DEL PROYECTO

NOMBRE Y FIRMA DEL PADRE/MADRE/TUTOR

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO
Domicilio _____

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO
Domicilio _____

CIUDAD DE MEXICO A _____ DEL MES DE _____ DEL 2020

Avenida Insurgentes S/N, Sección XV, Alameda Tlalcan, C.P. 06000, Ciudad de México
Tel.: 555379-2911 ext. 24302, 24303 | <http://www.institutoignacio.org.mx>

Anexo 03
Cuestionario



Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
"Estudio de los microRNA's y RNA's circulares y su asociación con la enfermedad congénita cardíaca en pacientes pediátricos"

CUESTIONARIO

FECHA: _____ DIAGNOSTICO _____ REGISTRO _____ PISO-CAMA _____

FICHA DE IDENTIFICACIÓN BEBÉ

Las siguientes preguntas son sobre su bebé

NOMBRE _____ SEXO (femenino (masculino
(APELLIDO PATERNO) (APELLIDO MATERNO) (NOMBRES)

FECHA DE NACIMIENTO _____ / _____ / _____ EDAD _____ PESO (kg) _____ TALLA (cm) _____
DIA/ MES / AÑO (AÑOS) (MESES) (DÍAS)

LUGAR DE NACIMIENTO _____ LUGAR DE RESIDENCIA _____
(ESTADO) (DELEGACION/MUNICIPIO) (ESTADO) (DELEGACION/MUNICIPIO)

GRUPO SANGUINEO Y RH: ()O+ ()O- ()A+ ()A- ()B+ ()B- ()O+ () no sé PESO (kg) _____ TALLA (cm) _____

FICHA IDENTIFICACIÓN MADRE

NOMBRE _____ EDAD _____ ESTADO CIVIL _____
(APELLIDO PATERNO) (APELLIDO MATERNO) (NOMBRES)

FECHA DE NACIMIENTO _____ / _____ / _____ EDAD _____ PESO (kg) _____ TALLA (cm) _____ IMC _____
DIA/ MES / AÑO
 ESCOLARIDAD _____ OCUPACION _____

LUGAR DE RESIDENCIA _____
(ESTADO) (DELEGACION/MUNICIPIO)

DIRECCIÓN _____

TELEFONO DE CONTACTO: a) _____ b) _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES DEL BEBÉ (papá, mamá, hermanos, tíos, abuelos del paciente)

	LUGAR NACIMIENTO <small>(ESTADO Y DELEGACION O MUNICIPIO)</small>	LUGAR DE RESIDENCIA <small>(ESTADO Y DELEGACION O MUNICIPIO)</small>
PADRE	_____	_____
ABUELOS MATERNOS	Abuela _____	_____
	Abuelo _____	_____
ABUELOS PATERNOS	Abuela _____	_____
	Abuelo _____	_____

¿Hay consanguinidad entre parientes? Si _____ no _____

¿Alguno de sus familiares cercanos que estén relacionados con usted por sangre (madre, padre, hermanas o hermanos) ha tenido alguna de las condiciones que se enumeran a continuación?

Para cada elemento, marque **No** si nadie en su familia tiene la afección, **Si** si alguien de su familia tiene la afección o **NS** si no lo sabe.

	SI	NO	NS
Obesidad	_____	_____	_____
cáncer	_____	_____	_____
Diabetes Mellitus	_____	_____	_____
Hipertensión arterial	_____	_____	_____
Enfermedades cardiovasculares	_____	_____	_____
Malformaciones del corazón	_____	_____	_____
Enfermedades autoinmunes	_____	_____	_____
Síndrome de Down	_____	_____	_____
Malformaciones al nacimiento	_____	_____	_____

Otras _____

¿Fueron diagnosticadas por un médico? Si _____ no _____

ANTES DEL EMBARAZO

Las siguientes preguntas son sobre usted en el tiempo antes de quedar embarazada

ANTECEDENTES MATERNOS GINECOOBSTETRICOS DE LA MADRE

1. ¿Cuántas veces ha estado embarazada? _____
2. Número de partos _____
3. Número de cesáreas _____
 - 3.1. Motivo de cesárea _____
4. Número de abortos (indicar trimestre y causa si se conoce) _____
5. Número de hijos vivos _____

ANTICONCEPCIÓN

¿Qué método anticonceptivo estaba usando cuando quedó embarazada? Marque todo lo que corresponda

- Pastillas anticonceptivas
- Condones
- Vacunas o inyecciones (Depo-Provera®)
- Implante anticonceptivo en el brazo (Nexplanon® o Implanon®)
- Parche anticonceptivo (OrthoEvra®) o anillo vaginal (NuvaRing®)
- DIU (incluidos Mirena®, ParaGard®, Liletta® o Skyla®)
- Planificación familiar natural (incluido el método del ritmo)
- Interrupción coito
- Otro: _____

Cuando quedó embarazada de su bebé, ¿estaba tratando de quedar embarazada?

- Sí No

REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y FERTILIDAD

¿Tomó algún medicamento para la fertilidad o recibió algún procedimiento médico de un médico, enfermera u otro profesional de la salud para ayudarla a quedar embarazada de su bebé? Esto puede incluir tratamientos para la infertilidad, como medicamentos para mejorar la fertilidad o tecnología de reproducción asistida.

- No (continuar con la siguiente sección "comorbilidades")
 Sí

¿Utilizó alguno de los siguientes tratamientos de fertilidad durante el mes en que quedó embarazada de su bebé? Marque todo lo que corresponda

- Medicamentos para mejorar la fertilidad recetados por un médico
 (los medicamentos para la fertilidad incluyen Clomid®, Serophene®, Pergonal® u otros medicamentos que estimulan la ovulación)
- Inseminación artificial o inseminación intrauterina
 (tratamientos en los que se recolectan espermatozoides, pero NO óvulos, y se colocan médicamente en el cuerpo de una mujer)
- Otro tratamiento médico (Indíquenos): _____

COMORBILIDADES

Durante los 3 meses antes de quedar embarazada de su bebé, ¿tuvo alguna de las siguientes condiciones de salud? Para cada uno, marque No si no tenía la afección o Si si la tenía.

	SI	NO	Tiempo de evolución	En control		Tratamiento
				SI	NO	
Diabetes mellitus	___	___	_____	___	___	_____
Indique con una X si tiene () DM tipo 1 o () DM tipo2						
Hipertensión arterial	___	___	_____	___	___	_____
Enfermedad del corazón (especifique cuál) _____	___	___	_____	___	___	_____
Obesidad	___	___	_____	___	___	_____
Depresión	___	___	_____	___	___	_____
Enfermedad autoinmune (especifique cuál) _____	___	___	_____	___	___	_____
VIH/ SIDA	___	___	_____	___	___	_____
Otra: _____	___	___	_____	___	___	_____
Otra: _____	___	___	_____	___	___	_____

¿Fueron diagnosticadas por un médico? Si _____ no _____

SUPLEMENTOS

Durante el mes anterior a quedar embarazada de bebé, ¿cuántas veces a la semana tomó un multivitamínico, una vitamina prenatal o una vitamina del ácido fólico?

	No tomó	1 a 3 veces por semana	4 a 6 veces por semana	Todos los días de la semana
Acido fólico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hierro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Multivitamínicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

MEDICAMENTOS

Durante el mes antes de quedar embarazada, ¿tomó o usó alguno de los siguientes medicamentos por algún motivo? Para cada artículo, marque No si no lo usó o Si si lo hizo.

	Nunca	MES		SEMANA			DIA			
		Menos de una vez al mes	1-3 veces al mes	Veces a la semana			Veces al día			
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6
Analgésicos de venta libre Por ejemplo: aspirina, Tylenol®, Advil® o Aleve®	<input type="checkbox"/>									
Analgésicos recetados -hidrocodona (Vicodin®) -oxicodona (Percocet®) -codena	<input type="checkbox"/>									
Adderall®, Ritalin® u otro estimulante	<input type="checkbox"/>									
Metadona, naloxona, subutex o Suboxone®	<input type="checkbox"/>									
Otro: _____	<input type="checkbox"/>									
Otro: _____	<input type="checkbox"/>									

CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHOLICAS

¿Durante cuánto ha consumido bebidas alcohólicas? _____

¿Ingerió alguna bebida alcohólica tres meses antes del embarazo? () si () no (continúe con la sección tabaquismo)

Durante los 3 meses antes de quedar embarazada, ¿cuántas bebidas alcohólicas tomaba en promedio?

Una bebida es 1 copa de vino, lata o botella de cerveza, trago de licor o bebida mezclada.	Nunca	MES		SEMANA			DIA			
		Menos de una vez al mes	1-3 veces al mes	Veces a la semana			Veces al día			
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6
Más de 3 bebidas	<input type="checkbox"/>									
1 a 3 bebidas	<input type="checkbox"/>									
Menos de 1 bebida	<input type="checkbox"/>									

Durante los tres meses antes del embarazo, cuántas veces se encontraba en estado de embriaguez:
 nunca esporádicamente Una vez al mes una vez por semana diario

¿Qué tipo de bebida ingería con frecuencia?

vino cerveza tequila vodka whiskey otro, indiquenos: _____

TABAQUISMO

En los 3 meses antes de quedar embarazada, ¿cuántos cigarrillos fumaba en un día promedio, especifique el número junto a su respuesta?

* Un paquete tiene 20 cigarrillos.

- 41 cigarrillos o más _____
- 21 a 40 cigarrillos _____
- 11 a 20 cigarrillos _____
- 6 a 10 cigarrillos _____
- 1 a 5 cigarrillos _____
- Menos de 1 cigarrillo _____

No fumaba → continuar en la siguiente sección FUMADOR PASIVO

¿Durante cuánto tiempo fumó? (meses o años) _____

¿Lo suspendió? (sí/no) _____

¿Si lo suspendió, cuanto tiempo antes del embarazo dejó de fumar? _____

FUMADOR PASIVO

En los 3 meses antes de quedar embarazada fue fumadora pasiva

No → continuar en la siguiente sección DROGAS

Sí

¿Por cuanto tiempo fue fumador pasivo? _____

¿Cuántas horas al día era fumador pasivo? _____

DROGAS

Durante el mes antes de quedar embarazada, ¿tomó o usó alguno de los siguientes drogas por algún motivo?

Para cada artículo, marque Nunca si no lo usó (continúe a la siguiente sección), o si lo hizo, marque la frecuencia de consumo

	Nunca	MES		SEMANA			DÍA				
		Menos de una vez al mes	3-5 veces al mes	Veces a la semana			Veces al día				
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6	
Mariguana	<input type="checkbox"/>										
Heroina	<input type="checkbox"/>										
Anfetaminas	<input type="checkbox"/>										
Cocaína	<input type="checkbox"/>										
Tranquilizantes	<input type="checkbox"/>										
Alucinógenos	<input type="checkbox"/>										
Inhalar gasolina, pegamento, lejas de aerosol o pintura para drogarse	<input type="checkbox"/>										
Otro: _____	<input type="checkbox"/>										
Otro: _____	<input type="checkbox"/>										

¿Lo suspendió? (sí/no) _____

¿Si lo suspendió, cuanto tiempo antes del embarazo dejó de consumir la droga antes marcada? _____

DURANTE EL EMBARAZO

La atención prenatal incluye visitas a un médico, enfermera u otro profesional de la salud antes de que nazca su bebé para recibir chequeos y consejos sobre el embarazo.

Justo antes de quedar embarazada de su bebé, ¿cuánto pesaba? (kg) _____

¿Cuántas semanas o meses de embarazo tenía cuando tuvo su primera visita de atención prenatal?

Semanas de embarazo _____ o Meses _____
 No recibí atención prenatal

Durante su embarazo más reciente, ¿tuvo alguna de las siguientes condiciones de salud? Para cada uno, marque No si no padecía la afección o Sí si la padecía.

	Sí	No	¿controlada?		¿Requirió hospitalización?		Tratamiento
			Sí	no	Sí	no	
Hipertensión gestacional	___	___	___	___	___	___	_____
Preeclampsia	___	___	___	___	___	___	_____
Eclampsia	___	___	___	___	___	___	_____
Diabetes gestacional	___	___	___	___	___	___	_____
Anemia	___	___	___	___	___	___	_____
Enfermedades febriles	___	___	___	___	___	___	_____
Depresión	___	___	___	___	___	___	_____
Otro: _____	___	___	___	___	___	___	_____
Otro: _____	___	___	___	___	___	___	_____
Otro: _____	___	___	___	___	___	___	_____

¿Fueron diagnosticadas por un médico? Sí _____ no _____

SUPLEMENTOS VITAMINICOS

Durante su embarazo, ¿cuántas veces a la semana tomó ácido fólico, hierro, multivitamínicos?

	No tomé	1 a 3 veces por semana	4 a 6 veces por semana	Todos los días de la semana
Acido fólico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hierro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Multivitamínicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

A partir de que trimestre: 1° trimestre (1-3 meses de embarazo) 2° trimestre (3-6 meses de embarazo) 3° trimestre (6-9 meses de embarazo)

MEDICAMENTOS

Durante el mes antes de quedar embarazada, ¿tomó o usó alguno de los siguientes medicamentos por algún motivo? Para cada artículo, marque No si no lo usó o Si si lo hizo.

	Nunca	MES		SEMANA			DIA			
		Menos de una vez al mes	1-3 veces al mes	Veces a la semana			Veces al día			
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6
Analgésicos de venta libre Por ejemplo: aspirina, Tylenol®, Advil® o Aleve®	<input type="checkbox"/>									
Analgésicos recetados -hidrocodona (Vicodin®) -oxicodona (Percocet®) -codona	<input type="checkbox"/>									
Adderall®, Ritalin® u otro estimulante	<input type="checkbox"/>									
Metadona, naloxona, subutex o Suboxone®	<input type="checkbox"/>									
Otro: _____	<input type="checkbox"/>									
Otro: _____	<input type="checkbox"/>									

A partir de que trimestre:

1° trimestre
(1-3 meses de embarazo)

2° trimestre
(3-6 meses de embarazo)

3° trimestre
(6-9 meses de embarazo)

CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHOLICAS

¿Ingerió alguna bebida alcohólica durante el embarazo? () sí () no (continúe con la sección tabaquismo)

Una bebida es 1 copa de vino, lata o botella de cerveza, trago de licor o bebida mezclada.	Nunca	MES		SEMANA			DIA			
		Menos de una vez al mes	1-3 veces al mes	Veces a la semana			Veces al día			
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6
Más de 3 bebidas	<input type="checkbox"/>									
1 a 3 bebidas	<input type="checkbox"/>									
Menos de 1 bebida	<input type="checkbox"/>									

Cuántas veces se encontraba en estado de embriaguez:

() nunca () esporádicamente () Una vez al mes () una vez por semana () diario

¿Qué tipo de bebida ingería con frecuencia?

() vino () cerveza () tequila () vodka () whisky () otro: _____

¿Lo suspendió? (si/no) _____

A partir de que trimestre:

1° trimestre
(1-3 meses de embarazo)

2° trimestre
(3-6 meses de embarazo)

3° trimestre
(6-9 meses de embarazo)

TABAQUISMO

¿Durante su embarazo ingirió nicotina en alguna de sus presentaciones? (cigarro, puro, vaporizador, etc)

() si () no (continúe con la sección fumador pasivo)

A partir de que trimestre: 1° trimestre (1-3 meses de embarazo) 2° trimestre (3-6 meses de embarazo) 3° trimestre (6-9 meses de embarazo)

¿cuántos cigarrillos fumaba en un día promedio, especifique el número junto a su respuesta? Un paquete tiene 20 cigarrillos.

- 41 cigarrillos o más _____
 21 a 40 cigarrillos _____
 11 a 20 cigarrillos _____
 6 a 10 cigarrillos _____
 1 a 5 cigarrillos _____
 Menos de 1 cigarrillo _____

FUMADOR PASIVO

Durante su embarazo estuvo expuesta al humo de cigarro

No → continuar en la siguiente sección DROGAS

Si

¿Por cuanto tiempo fue fumador pasivo? _____

¿Cuántas horas al día era fumador pasivo? _____

DROGAS

Durante su embarazo, ¿tomó o usó alguno de los siguientes drogas por algún motivo? Para cada artículo, marque Nunca si no lo usó (continúe a la siguiente sección), o si lo hizo, marque la frecuencia de consumo

	Nunca	MES		SEMANA			DÍA				
		Menos de una vez al mes	2-3 veces al mes	Veces a la semana			Veces al día				
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6	
Mariguana	<input type="checkbox"/>										
Heroína	<input type="checkbox"/>										
Antetaminas	<input type="checkbox"/>										
Cocaína	<input type="checkbox"/>										
Tranquilizantes	<input type="checkbox"/>										
Alucinógenos	<input type="checkbox"/>										
Inhalar gasolina, pegamento, latas de aerosol o pintura para drogarse	<input type="checkbox"/>										
Otro: _____	<input type="checkbox"/>										
Otro: _____	<input type="checkbox"/>										

¿Lo suspendió en algún momento? (si/no) _____

A partir de que trimestre: 1° trimestre (1-3 meses de embarazo) 2° trimestre (3-6 meses de embarazo) 3° trimestre (6-9 meses de embarazo)

FICHA IDENTIFICACIÓN PADRE

NOMBRE _____ EDAD _____ ESTADO CIVIL _____
(APELLIDO PATERNO) (APELLIDO MATERNO) (NOMBRES)

FECHA DE NACIMIENTO _____ / _____ / _____ EDAD _____ PESO (kg) _____ TALLA (cm) _____ IMC _____
DÍA MES AÑO

ESCOLARIDAD _____ OCUPACION _____

LUGAR DE RESIDENCIA _____
(ESTADO) (DELEGACION/MUNICIPIO)

DIRECCIÓN _____

TELÉFONO DE CONTACTO: a) _____ b) _____

Anexo 04

Técnica de extracción de RNA con kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (50).

- 1.- Preparar la muestra de plasma 200 μ L.
- 2.- Se transfieren 200 μ L de plasma en tubos de 2ml.
- 3.- Añadir buffer RPL 60 μ L, tapar tubos, vortexear 5 segundos e incubar a temperatura ambiente por 3 min.
- 4.- Añadir buffer RPP 20 μ L, tapar tubos y vortexear por 20 segundos e incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos
- 5.- Centrifugar a 10, 500 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Transferir el sobrenadante sin tocar el pellet (con un volumen aproximado de 230-240 μ L) a un nuevo tubo, añadir el mismo volumen que se obtuvo de sobrenadante, pero de isópropanol) vortexear por 15 segundos aproximadamente.
- 7.-Transferir el volumen del paso 6 (volumen aproximado de 460 μ L) al tubo con columna (RNeasy UCP Min flute colum), cerrar y centrifugar a 8700 rpm por 15 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 8.- Agregar a la columna 700 μ L de buffer RWT en la columna, cerrar y centrifugar a 8700 rpm por 15 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 9.- Agregar a la columna 500 μ L de buffer RPE y centrifugar a 8700 rpm por 15 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 10.- Agregar 500 μ L de etanol al 75% a la columna y centrifugar a 8700 rpm por 2 min.
- 11.- Poner la columna en un nuevo tubo (incluido en el kit) de 2 ml y centrifugar a velocidad máxima con la tapa abierta por 5 min para secar la membrana.
- 12.- Pasar la membrana a un nuevo tubo de 1.5 ml y agregar agua libre de RNAsa.
- 13.- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 14.- Centrifugar a velocidad máxima por un minuto para obtener el RNA
- 15.- Desechar la membrana.
- 16.- Congelar a -70°C

Anexo 05

Transcripción reversa de micro-RNA

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:
 - 0.75 μ L del Primer específico del miRNA de estudio (20x)
 - 0.15 μ L de dNTPs (100 mM)
 - 1.0 μ L de Transcriptasa reversa (50 u/ μ L)
 - 1.5 μ L de Buffer (10x)
 - 0.19 μ L de inhibidor de RNasa (20 u/ μ L)
 - 9.41 μ L de agua libre de RNasas
2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.
3. En tubos de 0.2 mL, agregar 13 μ L de la mezcla anterior y 2 μ L de RNA total a una concentración final de 10 ng/ μ L.
4. Centrifugar cada tubo para mezclar las muestras.
5. Colocar los tubos adecuadamente en
6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	16 °C	42 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	30 min	30 min	5 min	∞
7. Guardar las muestras de cDNA total a -80 °C

Anexo 06

Transcripción reversa de RNA total

Siguiendo las indicaciones del kit “HighCapacity cDNA Reverse Transcription”:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:

- 0.75 μ L de RT Random Primers (10x)
- 0.15 μ L de dNTPs (100 mM)
- 1.0 μ L de Transcriptasa reversa (50 u/ μ L)
- 1.5 μ L de Buffer (10x)
- 0.19 μ L de inhibidor de RNasa (20 u/ μ L)
- 9.41 μ L de agua libre de RNasas

En el caso de el gen constitutivo 39 se agrega

- 0.75 μ L de Spike y los valores no cambiaran, se ajustará a 8.75 μ L de agua libre de RNasas compensando los volúmenes.

2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.

3. En tubos de 0.2 mL, agregar 13 μ L de la mezcla anterior y 2 μ L de RNA total a una concentración final de 10 μ g/ μ L.

4. Centrifugar cada tubo para mezclar las muestras.

5. Colocar los tubos adecuadamente en el termociclador.

6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 7	Paso 8
Temperatura	16°C	50°C	42°C	50°C	85 °C	4° C
Tiempo	30min	30 seg	30 seg	1 seg	5 min	∞

7. Guardar las muestras de cDNA total a -80 °C

Anexo 07

PCR en tiempo real de miRNA

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:
 - 0.5 μ L del Ensayo TaqMan del RNAm específico de estudio (20x)
 - 5.0 μ L de Master Mix
 - 3.0 μ L de agua libre de RNasas
2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.
3. En una placa de 96 pozos, agregar 8.5 μ L de la mezcla anterior y 1.5 μ L de cDNA total.
4. Centrifugar la placa para mezclar las muestras.
5. Colocar la placa adecuadamente en el termociclador
6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes: Cada uno de 40 ciclos.

Cada uno de 40 ciclos.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min
