



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Identificación de los sncRNAs circulantes por secuenciación  
masiva (RNAseq) a lo largo del embarazo normal**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**Celaya Cruz Karen Rubi**

**Asesora: Dra. Erika Chavira Suárez**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

1. **La atención clínica: Fue realizada en el Hospital “Dr. Enrique Cabrera”, SEDESA, ubicado en: Prol. 5 de Mayo 3170, Ex hacienda de Tarango, Álvaro Obregón, Ciudad de México. Colaboradores:**
  - a. Nutrióloga: Magali Bravo Hernández
  - b. Enfermera: Betzabett Morales Rodríguez
  - c. Especialista en Perinatología y ginecobstetricia: Dra. Nidia Carolina Espinoza Maldonado.
  - d. Compañeros de servicio social: Alejandro, Diego, Gisella, Daniela, Juan Luis y Sofía
  
2. **La fase experimental:**
  - a. Unidad de Secuenciación del INMEGEN.
    - M. en C. Alfredo Mendoza Vargas
  - b. Consorcio de Metabolismo de RNA y Vesículas Extracelulares
    - Dr. Carlos Fabian Flores Jasso
    - Dra. Mariana Flores Torres
    - Biólogo Filiberto Bautista Moreno

Para la realización de esta tesis me fue otorgada una beca financiada por el “*Programa Universitario de Estudios de la Diversidad Cultural Interculturalidad*” - PUIC UNAM con número de registro 211.11

Este trabajo fue parcialmente subvencionado por el fondo de CONACYT A1-S-35245 y con recurso fiscal para el INMEGEN asociado al proyecto 07/2018/I.

## **Agradecimientos.**

Mi formación en la universidad fue un aprendizaje importante en mi vida ya que me ha brindado las herramientas necesarias para mi supervivencia cotidiana, por lo que pienso utilizarlos con sabiduría y regocijo. Agradezco a mis profesores y compañeros de la FESC por permitirme aprender de ellos, a mis padres por darme la oportunidad de salir de casa y apoyarme en cada una de mis locuras, a mis hermanos por aguantar mi ingenio y las regañadas afectuosas que acogí cuando extraviaba el piso. A mis amigos cercanos por darme la motivación y su amistad cada vez que tiraba la toalla.

Como segunda estancia agradezco a mi asesora de tesis por tener la gran paciencia y el apoyo absoluto tanto personal como en cada proceso de mi aprendizaje en esta área de la investigación básica. De igual manera, a mis compañeros del Inmegen por permitirme formar parte del equipo y darme de su tiempo incondicional colaborando en el proyecto.

La elaboración de esta tesis no fue sencilla y me siento muy orgullosa por poner a prueba muchas de mis aptitudes y habilidades para poder compartir con ustedes un poco del conocimiento científico y lo importante que es exponer la información recopilada en un grupo de estudio tan vulnerable como son las mujeres embarazadas. Durante la recolección de las muestras biológicas de estas mujeres se presentaron una serie de limitantes por lo que agradezco a cada una ellas por su apoyo voluntario. También, reconocer el papel que juega el Instituto Nacional de Medicina Genómica por prestar sus instalaciones, los equipos automatizados, los cursos impartidos y por supuesto, la atención cordial de sus empleados.

## **ABREVIATURAS.**

ADAR1: Adenosina deaminasa específica de RNA 1

ADAR2: Adenosina deaminasa específica de RNA 2

ADAR3: Adenosina deaminasa específica de RNA 3

Ago2: Argonauta 2

CSH1: Gonadotropina coriónica

CGB: Polipéptido beta

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

dsRNA: Ácido ribonucleico bicatenario

iRNA: RNA de interferencia

isomiR: Variantes de microRNAs

KCl: Cloruro de potasio

ME: Mujeres embarazadas

Mg: Magnesio

miRNAs: microRNAs

misc\_RNA: RNA miscelaneos

miRNA: microRNA

nt: Nucleótidos

NE: Mujeres no embarazadas

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de amonio

RNA: Ácido ribonucleico

RNA-Seq: Secuenciación de RNA

RISC: Complejo silenciador inducido

RDRC: Complejo de proteína dirigido para RNA

RPM: Lecturas por millón

rRNA: RNA ribosomal

scRNA: RNA citoplasmático corto

siRNA: RNA de interferencia

sncRNAs: RNAs no codificantes de cadena corta

snRNA: RNA nuclear corto

snoRNA: RNA nucleolar corto

tRNA: RNA de transferencia

PAPPA: Proteína plasmática asociada al embarazo

PDGF: Factor de crecimiento derivado de la placenta

PP: post-embarazo

piRNA: RNA asociados con el complejo piwi

XPO5: Exportina 5

## **SIGLAS.**

OMS: Organización Mundial de la Salud

NOM: Norma Oficial Mexicana

## **GLOSARIO.**

**Cuerpo vesicular:** Clase de vesícula extracelular que mide entre 500-2000 nm que se libera de las células.

**Exosoma:** Clase de vesículas pequeñas (40-150 nm diámetro) provenientes de membranas celulares que transportan proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros metabolitos.

**Microvesículas:** Trazas membranales (exosomas y cuerpo vesicular) que son derivados de los compartimentos celulares con funciones relacionadas a la señalización.

**Preeclampsia:** Síndrome que se presenta desde la vigésima semana del embarazo en el embarazo, durante el parto y puerperio, caracterizado por un aumento de la presión arterial y presencia de proteinuria.

**Pseudouridilación:** Es un proceso de isomerización por un nucleósido (Uridina) de una forma isomérica distinta modificando la función de los RNA no codificantes.

**Puerperio:** Periodo de cuarentena que pasa desde la expulsión de la placenta y el alumbramiento hasta que vuelvan a las condiciones pregestacionales.

**Regiones intrónicas:** Secuencias en el gen que no traducen.

**Regiones exónicas:** Secuencias en el gen con información codificante.

**Transposón:** Elemento genético exógeno transponible con información genética para poder integrarse dentro del genoma.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. Resumen .....   | 11 |
| 2. Introducción .....  | 12 |
| 3. Marco teórico .....   | 15 |
| 3.1 Clases de RNAs de cadena corta y tipos de secreción .....  | 15 |
| 3.1.1 Secreción de los sncRNAs por vesículas .....   | 22 |
| 3.1.2 Secreción de los sncRNAs unidos a lipoproteínas .....  | 24 |
| 3.1.3 Secreción de los sncRNAs por complejos proteicos.....  | 25 |
| 3.2 Participación de los sncRNAs circulantes en el embarazo y los métodos de<br>detección .....        | 27 |
| 3.2.1. Reacción de la cadena de la Polimerasa en tiempo real cuantitativa<br>(RT-qPCR).....            | 29 |
| 3.2.2 Microarreglos .....  | 32 |
| 3.2.3 Secuenciación masiva de Nueva Generación (RNA-Seq): Fundamentos<br>y calidad de la muestra ..... | 34 |
| 3.2.3.1 Preparación de la biblioteca y secuenciación por síntesis. ....                                | 35 |
| 3.2.4 sncRNAs como biomarcadores en el embarazo.....   | 40 |
| 4. Antecedentes.....   | 42 |
| 5. Objetivo General .....  | 46 |
| 6. Objetivos Particulares.....   | 46 |
| 7. Hipótesis.....  | 46 |
| 8. Planteamiento de problema .....   | 46 |
| 9. Justificación .....   | 47 |
| 10. Metodología .....  | 48 |
| 10.1 Sujetos de estudios .....   | 49 |
| 10.2 Colecta de muestra sanguínea periférica. ....   | 50 |

|   |    |
|---|----|
| 10.3 Extracción de RNA total en las muestras de sangre.....                                     | 50 |
| 10.4 Cuantificación de RNA total. ....  | 51 |
| 10.5 RT-PCR .....   | 51 |
| 10.6 Secuenciación de RNAs de cadena corta .....  | 52 |
| 10.7 Análisis bioinformático .....  | 53 |
| 11. Resultados.....   | 54 |
| 11.1 Características de los sujetos de estudio.....   | 54 |
| 11.2 Calidad en las muestras de RNA total y su cuantificación.....                              | 58 |
| 11.3 Controles de calidad en cada etapa de la generación de la biblioteca para<br>RNA-seq ..... | 60 |
| 11.4 Control de calidad en las lecturas de las muestras de cDNA<br>secuenciadas.....            | 65 |
| 12. Discusión .....   | 72 |
| 13. Conclusiones .....  | 79 |
| 14. Referencias.....  | 80 |

## 1. Resumen.

Los RNAs cortos no codificantes (sncRNAs) en la circulación materna están siendo estudiados como biomarcadores de procesos fisiológicos y patológicos en el embarazo. Las técnicas utilizadas para esta finalidad son hasta el momento: la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), los microarreglos de sncRNAs y la secuenciación masiva de nueva generación (RNAseq). Esta última permite identificar una mayor cantidad de clases de sncRNAs que aún no han sido caracterizados. Sin embargo, la cantidad de material genético inicial es un paso determinante que ha provocado el uso de muestras biológicas enriquecidas con el material mezclado de diferentes sujetos (pools). El objetivo de este trabajo consistió en la estandarización del aislamiento de RNA total y la secuenciación masiva (RNA-Seq) de sncRNAs en plasma con una cantidad mínima de muestra para la obtención de lecturas de buena calidad y cantidad. La relevancia de este desarrollo metodológico se basa en la obtención de material genético de cada mujer embarazada y el no tener que realizar mezclas enriquecidas de las mismas para la secuenciación. Los resultados obtenidos de veintidós muestras plasmáticas (dieciséis provenientes de cuatro mujeres embarazadas colectadas por trimestre de embarazo y después de su embarazo y, cinco provenientes de mujeres no embarazadas = muestras control), dieron un rango de lecturas normalizadas de 20 rpm hasta 886,850 rpm por cada clase de sncRNA encontradas en las bases de datos (FastQC, cutadapt, BWA, UNITAS), dichas lecturas determinaron una calidad buena. Esto permitió que desarrolláramos un análisis global de las abundancias relativas, obteniendo como resultado una mayor cantidad de microRNAs, misc\_RNA y RNAs no anotados en el plasma de ambos grupos de estudio. En conclusión, la tesis presente contribuye con el desarrollo metodológico para la obtención de material genético

en plasma a partir de una cantidad aprobada por la NOM 007-SSA2-2016 y el uso de la técnica de RNA-Seq para la identificación de sncRNAs en futuros estudios a lo largo del embarazo.

## **2. Introducción.**

Una gran variedad de ácidos nucleicos ha sido detectada en los fluidos biológicos (plasma, saliva, exudados y leche materna); entre ellos se han reportado los RNAs no codificantes de cadena corta (sncRNAs). Aún se desconoce su función o el producto de su aparición en dichos fluidos. No obstante, se sabe que la biogénesis de los sncRNAs en las células proviene de diferentes rutas de transcripción regulados por mecanismos específicos que se caracterizan por la edición de RNAs bicatenarios largos (dsRNAs) exógenos desencadenando precursores en forma de horquillas. Otra forma especializada es mediante la actividad de la enzima RNA polimerasa II provocando diferentes tamaños de las cadenas asociando con proteínas auxiliares. Los mecanismos de acción que participan para la síntesis de los sncRNAs son la represión postranscripcional, la escisión de dsRNAs y la degradación del mRNA (Hand J. & B. A., 2017) En el embarazo, la presencia de DNA fetal en la circulación la han descrito como una posible comunicación entre la madre y el feto, sin embargo, no se ha dilucidado su participación en cada trimestre del embarazo. Existen resultados de grupos de investigación (Cai M. *et al.*, 2017; Li H. *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2013) que demuestran la alta presencia de algunas clases de sncRNAs como son principalmente los miRNA, tRNA, rRNA, entre otros. Los miRNAs son la clase de sncRNAs mayormente estudiada por su participación en procesos celulares como son la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Estas moléculas están descritas principalmente en la regulación de la expresión de genes a nivel postranscripcional, dado que participa en el proceso de gestación están han sido ubicados específicamente en clúster en los

cromosomas 19 y 14 (Whan Y., 2017). La relevancia de estudiar y analizar la abundancia relativa en cada trimestre el embarazo la vincula principalmente en la regulación de una variedad de procesos biológicos como son la inflamación, diferenciación celular, apoptosis, entre otras funciones. La expresión diferencial de las clases de sncRNAs en la circulación pueden ser una herramienta para conocer las vías de señalización involucradas para el desarrollo de patologías relacionadas al embarazo. Existen diferentes hipótesis a cerca de la presencia de los sncRNAs en la circulación en el que mencionan sus funciones respecto a la placenta y la posible comunicación entre el feto y la madre (Ge *et al*, 2011; (Yang *et al.*, 2011). La gestación es un estado dinámico que implica múltiples cambios y adaptaciones fisiológicas, se ha demostrado que existen miRNAs específicos implicados en el desarrollo del trofoblasto, implantación, crecimiento placentario y mantenimiento del embarazo (Morales P. & M. UR., 2011). Hay que mencionar también que su expresión se ve modificada con el desarrollo de enfermedades como la diabetes gestacional, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino y parto pretérmino. La caracterización de los cambios observados en los perfiles de expresión de los miRNAs específicos del embarazo han sido propuestos para funcionar como biomarcadores de eventos patológicos (Cai M. *et al.*, 2017; Cretoiu D. *et al.*, 2016). La procedencia de los sncRNAs hacia la circulación sanguínea está descrita en complejos macromoleculares que son llamados vesículas extracelulares (exosomas, cuerpos apoptóticos, microvesículas) y unidos a proteínas (Ago 2 y HDL). Recientemente en un estudio exhaustivo sobre la composición de los exosomas, se presentaron evidencias sobre la secreción extracelular de los exosomas que no contienen material genético, además, estos complejos no contienen las proteínas moleculares para efectuar la biogénesis de los miRNAs (Jeppesen *et al.*, 2019).

Existen técnicas que se utilizan para la detección de los sncRNAs como son la RT-qPCR, microarreglos y secuenciación masiva. La RT-qPCR es una técnica que se caracteriza por ser específica, precisa y reproducible ya que permite cuantificar la expresión génica. Sin embargo, el número limitante de genes a identificar pone en desventaja en la búsqueda de nuevos blancos moleculares. Los microarreglos es una técnica que se basa en la hibridación de la sonda para detectar la secuencia objetivo, es específica, precisa, no obstante, existen secuencias de sncRNAs que cambian por un solo nucleótido. La secuenciación masiva es una tecnología que te proporciona millones de lecturas confiables en una muestra realizando una búsqueda a través de análisis bioinformáticos. Sin embargo, el alto costo y el análisis computacional en bases de datos pone en desventaja su elección para el estudio de los sncRNAs (Wadapurkar R. M., V. R., 2018).

Las investigaciones que reportan las abundancias relativas de otras clases de sncRNAs circulantes en plasma por medio de la técnica de secuenciación masiva, hacen mención que posiblemente existe una liberación a partir de la placenta y la relacionan con la condición de embarazo (D.I. *et al.*, 2018; Kotlabova *et al.*, 2011). Por lo tanto, en este trabajo de tesis se pretende demostrar que la presencia de los sncRNAs en plasma de mujeres embarazadas puede aportar evidencia de otras clases de sncRNAs que no han sido descrito en otros grupos de investigación. Por otro lado, estandarizar la secuenciación masiva en una condición metodológica diferente en un estudio longitudinal.

### **3. Marco Teórico.**

#### **3.1 Clases de RNAs de cadena corta y tipos de secreción.**

Las células sintetizan diferentes clases de RNAs para el funcionamiento y sostén. En estos se encuentran los RNA mensajeros (mRNAs), que codifican para proteína y los RNAs no codificantes que se clasifican en dos grandes grupos, los RNAs de cadena larga (lncRNA) y los RNAs de cadena corta (sncRNAs). Los sncRNAs se diferencian de los lncRNAs por su tamaño (lncRNA  $\geq 200$  nucleótidos), origen, estabilidad, función, diversidad y su abundancia en los tejidos. A su vez, los sncRNAs se clasifican en biotipos según sus particularidades moleculares y sus funciones biológicas como son el silenciamiento genético a través de su empalme específico con el mRNA, el silenciamiento de la cromatina (heterocromatina) y otras funciones que aún han sido poco esclarecidas por su ubicación fuera de la célula en el torrente sanguíneo (Rizvi F. N. Smith F. G., 2017).

Dentro de los biotipos de sncRNAs que se han descrito en la literatura, se incluyen los RNA de transferencia (tRNA), el RNA ribosomal (rRNA), el microRNA (miRNA), variantes de miRNA (isomiR), el RNA nucleolar corto (snoRNA), el RNA nuclear corto (snRNAs), el RNA interferente (siRNAs), RNA de interferencia (iRNA) y el RNA citoplasmático corto (scRNA) y los RNA asociados con el complejo piwi (piRNA) (Kim N., 2005).

El proceso de transcripción consiste en generar una cadena de RNA que es controlado por la interacción de promotores y potenciadores. La transcripción varía de acuerdo a la clase de sncRNA, en algunos de ellos implica la participación de proteínas como Dicer y Drosha, en otras clases interfieren complejos de silenciamiento inducido y proteínas dirigidas a RNA que provocan la formación de precursores. Los precursores se forman a partir de regiones intrónicas,

exónicas, transposones y retrotransposones que permiten que exista una característica particular y una complejidad en cada una de las estructuras de los sncRNAs ocasionando un cambio en las funciones celulares (Mattick J. S., Makunin I. V., 2005).

Cada uno de estos detalles moleculares durante el proceso de la transcripción determina el tamaño del fragmento, el tipo de mecanismo de acción y la regulación de la expresión de los sncRNAs (Kawaji H *et al.*, 2008). Tanta variedad en los biotipos de los sncRNAs se debe a la especificidad desarrollada por las células eucariontes para expresar diferentes tipos de RNA polimerasas (RNAP) (Grobhans H. & Filipowicz W., 2008). Estas enzimas están clasificadas (pol I, pol II, pol III) por su orden de actividad y se ensamblan de acuerdo con la síntesis de las diferentes clases de sncRNA.

La RNA pol contiene un centro activo conservado que le permite realizar varias funciones como son la regulación de la transcripción a través de su interacción con la región promotora en los genes, catalizando la síntesis y elongación de la cadena de RNA, además de reconocer y reparar parcialmente la molécula del molde del DNA provocando la síntesis de los precursores de mRNA, miRNAs, rRNA grandes y otros tipos de RNAs (Engel *et al.*, 2017).

La modificación que produce la enzima polimerasa (I, II ó III) en los dominios del dsRNA provoca cambios estructurales específicas y únicas para cada tipo de sncRNAs. Los sncRNAs son productos intermedios moduladores de genes codificantes para la síntesis del mRNA. La biogénesis de los sncRNAs está compuesta de varias rutas de síntesis en las que participan: las enzimas que pertenecen al grupo de RNA pol (I, II y III), promotores, factores de transcripción, complejos de proteínas y enzimas moduladoras (ADAR1, ADAR 2, ADAR 3) de la transcripción de genes que pueden modificar la expresión de las diferentes clases de RNAs (Kim *et al.*, 2009).

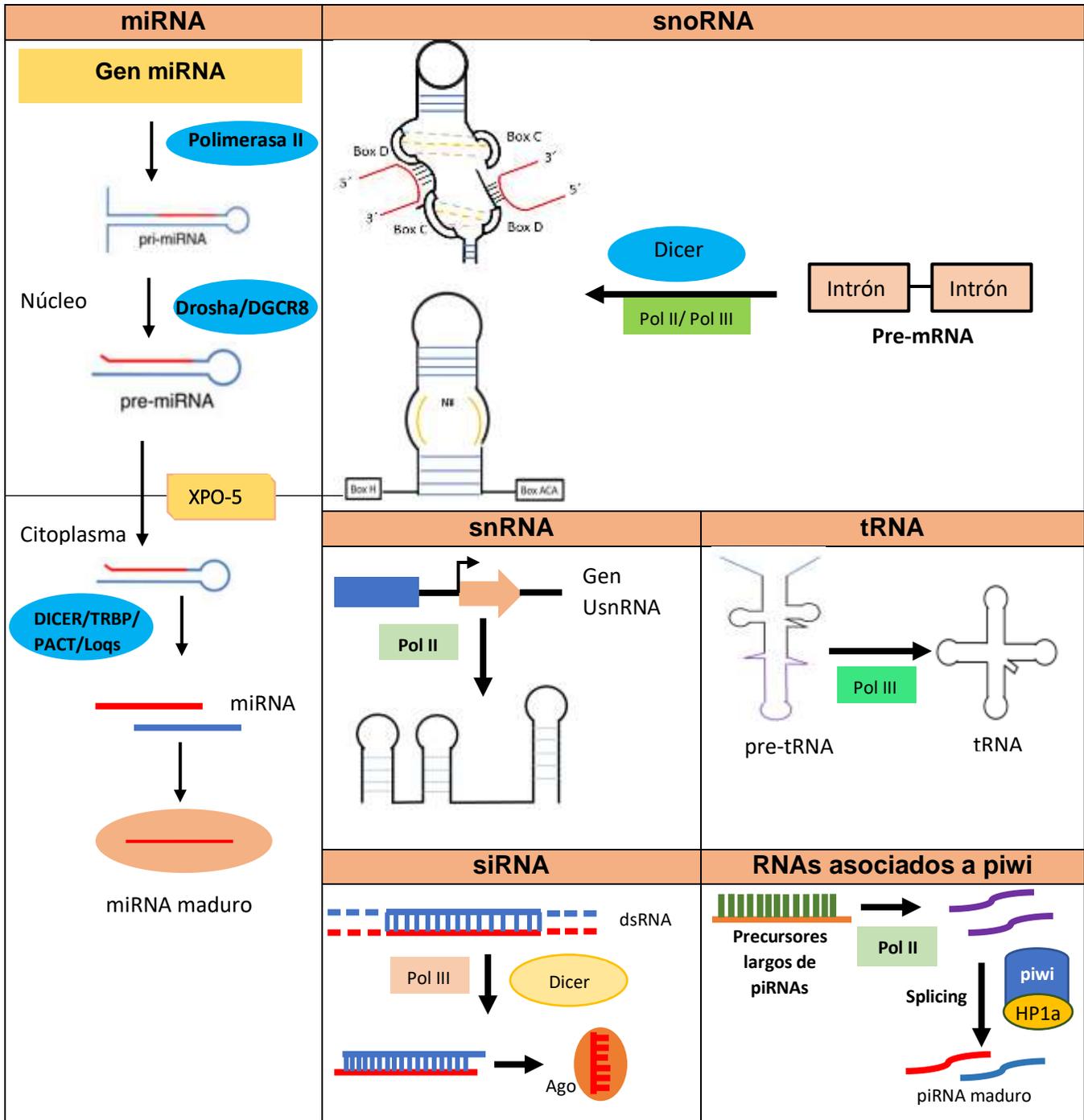
Los mecanismos de acción que más se han descrito en las clases de los sncRNAs son de los miRNAs, tRNA, snoRNAs, iRNA, siRNAs y snRNAs. Las semejanzas que tienen estas moléculas son a cerca de la modulación de los procesos celulares que se involucra en el cambio funcional celular de sus tejidos específicos de las diferentes clases de sncRNAs que participan de manera particular de acuerdo con el tipo de célula, destino celular, las condiciones biológicas, la abundancia celular y las redes regulatorias con las que se relacionan entre ellas. Las modificaciones que provocan los sncRNAs a través de interacciones entre genes permite una dinámica en las redes regulatorias que se relaciona con los niveles de expresión de los genes (Ghildiyal M. Zamore P., 2009). Algunos otros se co-expresan con el mRNA y posteriormente se liberan por escisión pasando la transcripción.

En las células, las diferentes clases de sncRNAs participan en la regulación de la expresión génica y en la modulación de la traducción del mRNA para la síntesis proteica (Raffi *et al.*, 2006), mediante mecanismos como 1) escisión endonucleotídica de los mRNAs; 2) represión de la traducción; 3) modificación transcripcional a través de cambios de DNA y/o histona y 4) eliminación de DNA mediante modificación de histona (Kim N., 2005). Estos mecanismos se presentan de forma momentánea y permiten detectarlos en tiempo y forma precisa. Un ejemplo de ello son los miRNAs que se relacionan con los procesos de regulación post-transcripcional modificando la expresión del mRNA (Adam *et al.*, 2017).

Las clases de sncRNAs son sintetizadas de manera particular, el transporte celular está relacionada con su precursor y la actividad de las proteínas. La biogénesis de los miRNAs que se encuentra en un tamaño de 19-26 nt involucra la participación de la enzima polimerasa II, Dicer y Drosha y exportina5 para su liberación nuclear hacia el citoplasma. Los snoRNA que son transcritos de 60-300 nucleótidos localizados en el nucléolo de la célula son sintetizados a

partir de los intrones de pre-mRNA, estos se caracterizan principalmente por contener motivos proteicos en los extremos de la cadena que se encuentran representados en dos clases: box C/D y box H/ACA. La diferencia entre ambos es que dirigen la unión entre los motivos y las proteínas blanco. Los snoRNAs funcionan en la metilación y pseudouridilación de los rRNAs 18S, 5.8S y 28S desempeñando una maduración del rRNA. Los snoRNAs se forman por el splicing alternativo mediados por la polimerasa II y III (Kiss T., 2002).

Los snRNAs son transcritos en el núcleo por la polimerasa II y III, midiendo aproximadamente 150pb. Los tRNA surgen del transcrito primario formando el pre-tRNA que contiene secuencias de 5'-líder y 3'-trailer y algunos casos parten de intrones en el bucle anticodón. La codificación parte del núcleo de la célula. Los tRNAs provocan una modificación en los mRNAs decodificando los nucleótidos por medio de los aminoácidos participando como un portador de aminoácidos (Anderson P., Ivanov P., 2015). El siRNA fue descubierto en la línea germinal, pero es una clase que es formado a partir de un precursor bicatenario de RNA, en el que es procesado por la enzima polimerasa III y Dicer (Carthew RW., Sontheimer EJ., 2009). Los piRNAs es un tipo de transcrito asociado a la proteína Piwi que tiene una longitud de 25 nt y se procesa a partir de precursores largos de piRNAs formando precursores pequeños de piRNAs. Estas estructuras pequeñas interactúan con la proteína Piwi y HP1a para inducir el silenciamiento a los transposones a través de mecanismos transcripcionales o postranscripcionales (Iwasaki *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Clases de snRNAs sintetizados por diferentes precursores. Los miRNAs, siRNAs y piRNAs se sintetizan a partir de transcritos primarios más largos con la ayuda de las enzimas pol II o pol III. (Creación propia del autor).

La participación de los sncRNAs permanece relacionada principalmente con la regulación de la expresión génica que impacta en los procesos celulares. Algunos ejemplos de los procesos celulares en el que más se ven involucrados son la proliferación y diferenciación celular, el crecimiento celular, la apoptosis, el metabolismo y defensa celular. Por otra parte, los sncRNAs han sido relacionados en los eventos reproductivos de las células humanas como son gametogénesis, espermatogénesis, desarrollo embrionario, neuronal, cardíaco e implantación (Zhang C., 2009). Existen estudios que demuestran la presencia de piRNAs, miRNA y siRNAs en relación con la función de la placenta humana (Timofeeva AV *et al*, 2018).

El embarazo es un proceso en el que ocurren cambios fisiológicos y anatómicos en la madre y en la que se lleva el crecimiento y desarrollo de un feto en un tiempo de 38-40 semanas de gestación (SDG). La comunicación entre el feto y la madre está condicionada por la placenta, un órgano transitorio que regula el aporte de metabolitos desde la circulación, en años recientes se ha sugerido su participación en la liberación de los sncRNAs propios de este órgano hacia la circulación materna, aunque sus funciones están todavía en estudio (Kotlabova *et al*. 2011).

Los sncRNAs son moléculas de interés debido a que regulan mecanismos precisos de los procesos celulares. Su abundancia y permanencia en la circulación no se encuentra completamente caracterizada, así como la posible relación con la función placentaria. Sin embargo, las investigaciones reportan que existe una secreción placentaria que podría establecerse como una comunicación entre células, dada su estabilidad en el medio exterior permite que las redes regulatorias afecten los eventos fisiológicos importantes en el embarazo y desencadenen enfermedades relacionadas con el mismo, por ejemplo, los trastornos hipertensivos, diabetes gestacional, parto pretérmino y desprendimiento de placenta (Morales P., 2014; Tsochandaridis *et al.*, 2015).

Existe una clase específica de sncRNAs que se ha estudiado con mayor profundidad. *Chim y colaboradores* realizaron estudios de caracterización para los miRNAs circulantes en plasma de las mujeres embarazadas para ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico prenatal (*Chim et al, 2008*). Ellos realizaron la caracterización de los miRNAs circulantes en cada estadio de la gestación y sus variaciones en la abundancia en la que pudo evidenciar específicamente aquellos pertenecientes del embarazo ( *Poirier C. et al., 2017*). De este tipo de trabajos surgen otros más que utilizan a ciertos miRNAs como marcadores de diabetes gestacional y preeclampsia (*Jairajpuri M et al., 2017; Ibarra V et al., 2018*). Sin embargo, de acuerdo con la abundancia de las otras clases de sncRNAs presentes en la gestación todavía no se ha relacionado con las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas del embarazo.

Los avances tecnológicos, como la secuenciación masiva, han permitido la identificación de otras clases de sncRNAs, de los cuales aún se desconoce su función celular. Existen reportes que demuestran la permanencia continúa de algunas clases: snoRNAs, piRNAs, tRNAs y rRNAs en periodos específicos del embarazo, en poblaciones humanas distintas (*Yang et al., 2011*). Tras la búsqueda de otras clases de sncRNAs circulantes se pretende tener opciones en la búsqueda de las redes de regulación participantes en los procesos fisiológicos propios del embarazo (*Fallen et al., 2018; Freedman et al., 2016*).

Las principales investigaciones que estudian los sncRNAs circulantes lo realizan en fluidos biológicos como el líquido amniótico, la saliva, la leche materna, la orina, los espermatozoides y la sangre (*Frydrychowicz K. et al., 2015*). Los ácidos nucleicos circulantes pueden provenir de varias fuentes, una de ellas puede ser por la lisis de las células sanguíneas como son las células nucleadas y no nucleadas, y otros provienen de la secreción celular y unidos a complejos proteicos (*Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012*).

La circulación de los sncRNAs en los fluidos biológicos las ha descrito por medio de una liberación vesicular que tienen un origen específico y que depende del tipo y función celular (Frydrychowicz *et al.*, 2015; Puhán *et al.*, 2017), por lo que es necesario evitar la degradación de las RNAsas presentes en el medio exterior (Nakano I. *et al.*, 2015). Estas secreciones modulan las vías de señalización que participan en la regulación de las respuestas fisiológicas de las células.

La secreción de estas moléculas en la circulación están descritas anteriormente por dos vías:

- 1) vesículas extracelulares (VE) compuestas de piezas desprendidas de membranas lipídicas
- 2) unida a proteínas como lo son el Argonauta 2 (Ago2) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que contienen a los sncRNAs (Arroyo JD *et al.*, 2011; Tong C., Chamley LW, 2015). Para el transporte de algunas clases de sncRNAs como los piRNA, miRNAs y siRNA requieren la participación del Ago2 (Kobayashi & Tomari, 2016; Zisoulis *et al.*, 2012).

No obstante, se ha encontrado un hallazgo que pone en controversia el contenido de los sncRNAs en estas estructuras proteicas. En un estudio reportaron que existen exosomas en el medio extracelular que no contiene dsDNA, sin embargo, proponen un mecanismo independiente del exosoma y dependiente de la autofagia y endosomas multivesiculares que promueve la secreción activa del DNA utilizando una maquinaria proteica para su secreción. Dado a que se está reevaluando la composición y el contenido del exosoma, está ocurriendo una mejora en la estandarización para la obtención de vesículas extracelulares respecto a su tamaño (Jeppesen *et al.*, 2019).

### **3.1.1 Secreción de los sncRNAs por vesículas**

La bibliografía describe que existen diversas vesículas extracelulares, de distintos tamaños con orígenes celulares y función diferentes y que pueden depender al microambiente celular, a las

cuales puede contener a los sncRNAs. Las vesículas extracelulares circulantes son clasificadas por su tamaño en microvesículas, nanopartículas, exosomas y cuerpos apoptóticos (Adam *et al.*, 2017). Las vesículas extracelulares no solo transportan ácidos nucleicos, sino también otras moléculas como son las hormonas, los lípidos o las citocinas, estas se encuentran regulando los mecanismos relacionados con el funcionamiento del sistema endocrino, nervioso, inmunológico y metabólico (Mincheva N., Baranov V., 2010).

El transporte vesicular se ha descrito por distintos mecanismos de biogénesis. El mecanismo mejor explicado son los mediados por los exosomas, debido a que su tamaño (50-100nm) y estabilidad en el medio externo de la célula permiten estudiarlos con relativa facilidad. Los exosomas se originan por un sistema endosómico tardío que consiste primeramente en la formación de endosomas, este proceso es provocado por complejo de proteínas ubiquitinazadas (ESCRT I, II, III), Rab 11, Rab 35 y Rab 37 a/b, la actividad Rab-GTPasas, la entrada de calcio, la reorganización del citoesqueleto y la calpaína (Colombo *et al.*, 2014; Ludwig & Giebel, 2012).

La secreción de los miRNAs es inducido por la exportina 5 hacia el citoplasma (Bhome *et al.*, 2018; Hombach *et al.*, 2016). Estos exosomas se han relacionado con una posible comunicación entre célula-célula en la que actúan como mediadores de los procesos biológicos (Record M, 2014). Los exosomas son cuerpos multivesiculares que principalmente transportan sncRNAs. Estos cuerpos exosomales se originan a partir de precursores conocidos como vesículas intraluminales (ILV, por sus siglas en inglés), formados en la luz de los cuerpos multivesiculares que se liberan por la vía endocítica y se pueden localizar en diferentes tipos de células. Estas estructuras se caracterizan por transportar componentes de señalización como son moléculas de adhesión celular, receptores de factor de crecimiento, adhesinas, proteínas RAB y proteínas de choque térmico (Zhou *et al.*, 2017).

### **3.1.2 Secreción de los sncRNAs unidos a lipoproteínas**

En un estudio realizado en el 2017 (Ultimo *et al*, 2017) un grupo de investigación de enfermedades cardiometabólicas demostraron una relación a la expresión de los miRNAs y la concentración de colesterol total en la sangre. Ellos sugerían que las lipoproteínas son portadores de los miRNAs en las que son mediadas por complejos proteicos como la ApoA1 / ABCA1, ABCG1 y un receptor SRB1. La biogénesis de las HDL forma un complejo entre estas estructuras que contienen transportadores transmembranales y su composición de fosfatidilcolina y esfingomielinasa neutra. Los receptores identificados en estas estructuras permiten unirse a los miRNAs de forma estructural, es así que Vickers en el 2011 demostró que las lipoproteínas derivadas del plasma pueden transportar a los miRNAs en la circulación plasmática (Vickers, K. *et al*, 2011). Por lo cual sugieren que otras clases de sncRNAs pueden también utilizar esta forma de transporte, aunque todavía no se ha demostrado (Michell & Vickers, 2016).

### 3.1.3 Secreción de los sncRNAs por complejos proteicos

La biogénesis de algunas clases de sncRNAs como los piRNA, miRNAs y siRNA requieren la participación de la proteína Argonauta (Ago2) (Kobayashi & Tomari, 2016). Estas clases de sncRNAs se asocia con el Argonauta para formar complejos de ribonucleoproteína para inducir el silenciamiento transcripcional o escisión del mRNA. El argonauta utiliza las funciones que ejercen otras proteínas como: miRNP, RITS, principalmente, el complejo de proteína inducido por RNA (RISC) para inhibir la expresión del gen diana. En estudios pasados, demostraron la presencia de una población de miRNAs circulantes en plasma asociado a Ago2 donde sugirieron que se transportaban por medio de estas estructuras (Arroyo *et al.*, 2011). La proteína argonauta se compone de dos dominios llamados PAZ y PIWI, su participación en el transporte de los sncRNAs se debe a la interacción que existe entre estos dominios y el extremo 3' UTR del RNA bicatenario.

Para conocer más acerca de las funciones de los sncRNAs se tuvieron que realizar una serie de experimentos en modelos animales y muestras de tejidos y fluidos biológicos en estado materno, Denis Lo detecto DNA fetal en plasma de mujeres embarazadas y sugirió su uso como medio de diagnóstico prenatal puesto que, estas pueden ser utilizadas para monitorear los eventos biológicos relacionados a la gestación (Lo *et al.*, 1997). Mas adelante, Ng y *colaboradores* detectaron mRNA placentario en plasma materno por lo cual demostró que el mRNA fue codificado por genes como CSH1, CGB Y CRH. Los genes correspondiente a las siguientes hormonas: gonadotropina coriónica (CSH1), polipéptido beta (CGB) y Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) presentaron un cambio de expresión en el progreso del embarazo (Chiu WK, Lui WB., 2006; Lo *et al.*, 1997).

Durante el embarazo, gran parte de la secreción vesicular placentaria se origina en la membrana plasmática (Mincheva N., Baranov V., 2010). Taylor y *colaboradores* describieron que la liberación de las vesículas extracelulares a partir de la placenta regula los procesos biológicos implicados en el desarrollo placentario y fetal. Además, estas vesículas sirven como medio de desecho de los organelos celulares (aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, el núcleo, citosol) (Record M., 2014). Sin embargo, aún se desconocen los factores que regulan su secreción (Freedman *et al.*, 2016).

La secreción de las vesículas extracelulares es activada por señales que provocan las células vecinas, el tejido en el que se encuentran y/o factores externos como es la hipoxia, la tensión superficial y concentración de glucosa (Truong *et al.*, 2017). Se han propuesto dos rutas diferentes para la formación de las vesículas y su desprendimiento celular. La formación de estas estructuras para su desprendimiento de la célula se ha propuesto en dos rutas diferentes: 1) Exocitosis por fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática mediante los lípidos fusogénicos como es el ácido fosfatídico; 2) Unión a complejos de moléculas Wnt/  $\beta$ -catenina para la fisión celular con la membrana plasmática (Colombo *et al.*, 2014; Record M., 2014; Pinzani *et al.*, 2010).

### **3.2 Participación de los sncRNAs circulantes en el embarazo y los métodos de detección**

La gestación implica numerosos cambios fisiológicos que mantienen los requerimientos materno-fetales. La placenta es el órgano primordial y transitorio sin el cual no se pueden llevar a cabo el proceso de embarazo, que entre las múltiples funciones que desempeña se encuentra la comunicación materno-fetal. Los principales procesos de los que se encargan son el transporte de nutrientes, el intercambio gaseoso, la regulación de la temperatura, la producción de hormonas y actualmente se le ha relacionado con la liberación de ácidos nucleicos de origen fetal como son el DNA y el RNA hacia el torrente sanguíneo de la madre. La participación del material genético aún no ha quedado clara. Sin embargo, existen estudios que demuestran que éstos provienen de la placenta y otros mencionan que participan en muchos procesos biológicos de la placenta (Ng *et al.*, 2003) (D.I. *et al.*, 2018).

Durante el proceso del embarazo, existe una mayor concentración de vesículas placentarias en la circulación en comparación con las mujeres no embarazadas (Adam *et al.*, 2017). Las evidencias reportadas en la literatura sugieren que existe una participación importante de los miRNAs en el desarrollo de la gestación. Entre los diversos procesos placentarios en los que pueden intervenir los miRNAs destacan la tolerancia inmune entre la madre y el feto, el estado metabólico, la maduración de los órganos fetales, los señalamientos paracrinos y el carácter fisiológico previniendo enfermedades relacionadas al embarazo como es la preeclampsia, la diabetes gestacional mellitus y la restricción de crecimiento intrauterino (Menon *et al.*, 2019).

Los procesos biológicos implicados para el desarrollo del embarazo son relacionados con la presencia de los miRNAs. La circulación de los miRNAs a través de los exosomas es orquestada por la placenta para comunicar las señales que regulan los genes diana de las células

receptoras. Los estudios en la caracterización de los exosomas provenientes de la placenta, plantean que existe una comunicación mediadora en la interfaz materno-fetal, transportando a las moléculas maternas hacia la circulación fetal y de forma viceversa. La interacción fetomaterna todavía no se ha descrito de manera clara. Sin embargo, la circulación de los miRNAs por medio de los exosomas sugiere que existe una comunicación de célula a célula afectando los procesos biológicos en diferentes condiciones fisiológicas del embarazo (Kotlabova *et al.*, 2011).

Varios miRNAs han sido investigados como moléculas asociadas al embarazo y en el que podrá señalar la condición de la placenta. Existen estudios que demuestran que los miRNAs en el embarazo regulan la función placentaria como son la proliferación celular del trofoblasto, la migración y la invasión, mientras que la expresión de otros miRNAs se relaciona con las complicaciones del embarazo, desarrollo fetal y trastornos asociados al embarazo. Los miRNAs presentes en el embarazo se pueden especificar de acuerdo a su origen, es decir, pueden provenir de tejido placentario, vellosidades coriónicas, así como de órganos fetales (Higashijima *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2018). Otros grupos de investigación sugieren que la expresión específica de los miRNAs depende del tipo de órgano y del tipo celular. No obstante, en el campo de la investigación aún no se ha logrado conectar los eventos biológicos específicos de tejidos y órganos en el embarazo (Luo *et al.*, 2009).

El monitoreo de estas moléculas en la circulación se está ocupando como posibles biomarcadores de diagnóstico no invasivo por lo que ya se tienen identificado a los miRNAs que se encuentran en cierto punto de la gestación. Por lo consiguiente, la estabilidad de los sncRNAs en la circulación permite su detección mediante técnicas de PCR cuantitativas, microarreglos y secuenciación masiva (Langseth *et al.*, 2018; Pan, 2012)

La detección de los sncRNAs circulantes que se lleva a cabo en fluidos biológicos necesita del uso de las tecnologías específicas para su estudio. En años recientes, los avances tecnológicos han ampliado las técnicas para hacer análisis de datos acerca del genoma humano y su aplicación en las ciencias genómicas. Las aplicaciones de las técnicas moleculares son primordiales en la metodología de la investigación, por lo que es importante tener muy definidas las características de cada una, asimismo, es importante considerar las limitantes de la técnica.

### **3.2.1. Reacción de la cadena de la Polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es el método de referencia para el análisis de expresión del mRNA en las células. La fusión de la RT-PCR y qPCR permite obtener una cuantificación absoluta de cDNA presentes en una muestra. La reacción consiste en tres pasos: 1) transcribir de forma reversa el RNA a una hebra de DNA complementario (cDNA), 2) alinear a cDNA la secuencia específica (primer) y 3) amplificar secuencias específicas del DNA o templado. Se conocen dos formas metodológicas de la técnica de RT- qPCR, una se basa en el uso de la sonda Taqman®, una sonda de hidrólisis en la que contiene cebadores no marcados; y en otro por el uso del SYBR Green que es un colorante que se une a la hebra cDNA y emite fluorescencia (Kuang *et al.*, 2018).

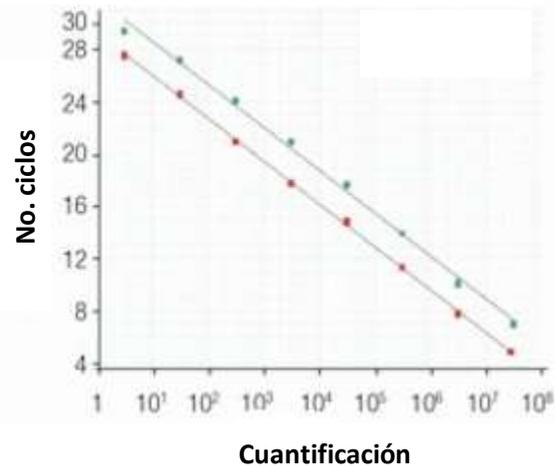
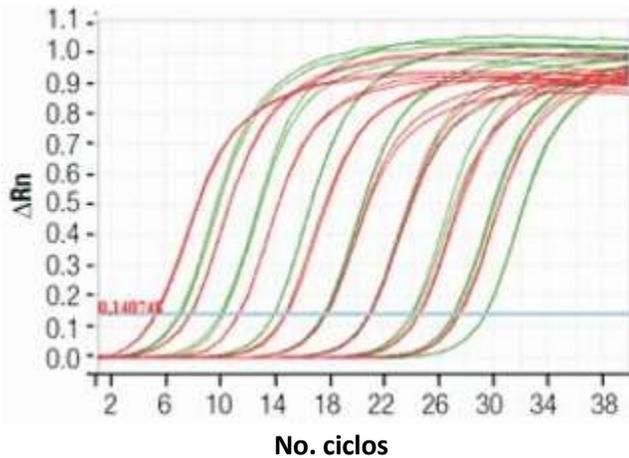
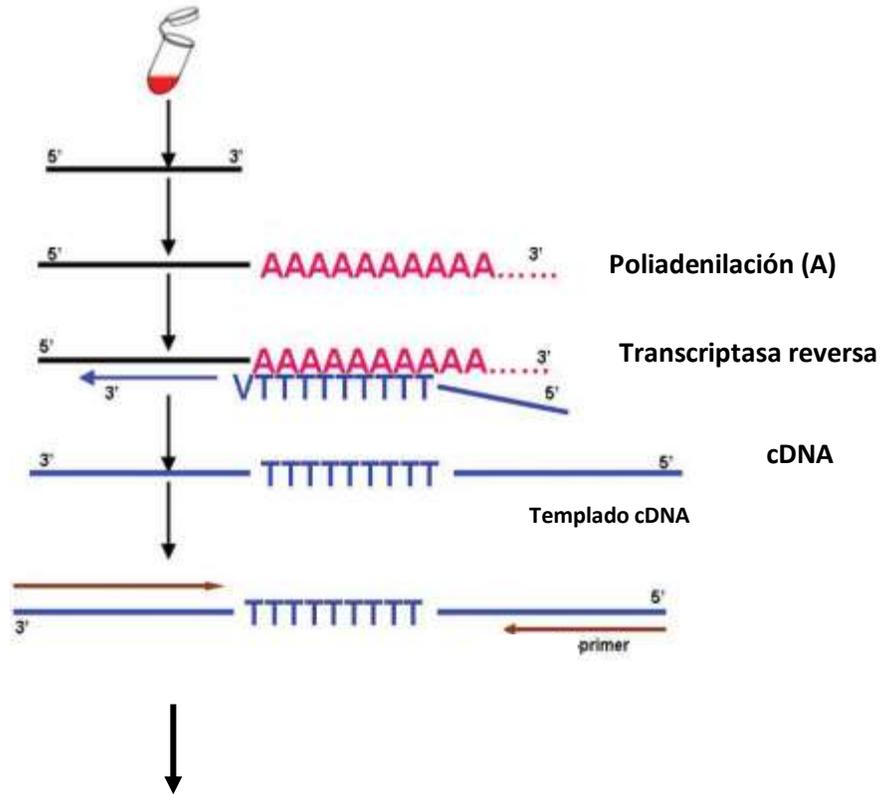
Ambos métodos tienen el principio de la formación de copias de DNA a partir de un fragmento de RNA por la enzima polimerasa. Para ello se tiene que emplear otros componentes como son cebadores diseñados para reconocer la región de interés, desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), templado de DNA, cofactores (Mg o Zn) y sales (KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) en el medio de reacción para mejorar la eficiencia de la enzima y tener un efecto amortiguador en la solución

para la amplificación, respectivamente. Los pasos de la técnica son la desnaturalización (96°C), templado (55°-65°C) y extensión (72°). Los ciclos se repiten entre 22-35 veces en una reacción típica de PCR tiempo real (Bachman, 2013).

La RT-qPCR se caracteriza por ser un método sensible, versátil, específico y reproducible. Existen variables de PCR que te permiten cuantificar de manera relativa o absoluta los blancos moleculares a identificar. La detección de las moléculas en estudio por medio de esta técnica, la concentración y la pureza son considerados poco estrictos comparado con otras técnicas moleculares. Consecuentemente, en RT-qPCR puede ser usado para detectar genes conocidos en una cantidad mínima que sea adaptable a la técnica, asimismo, puede provocar un aumento en la variación con el número de ciclos de acuerdo a la concentración de material genético necesario para el procedimiento que se requiere por lo que no se puede monitorear el tamaño de la amplificación (Smith & Osborn, 2009).

La cuantificación de mRNA por PCR puede demostrar pequeñas variaciones de amplificación y rendimiento entre las muestras (Bachman, 2013). Esta técnica permite demostrar los amplicones por cada ciclo de amplificación mediante la fluorescencia. La fluorescencia es medida de acuerdo con la unión de la sonda Taqman® y la unión con el cDNA. Esta fluorescencia nos indicara el número de cadenas de DNA sintetizadas y es específica de los genes diana (Hawkins *et al*, 2017).

## RNA TOTAL

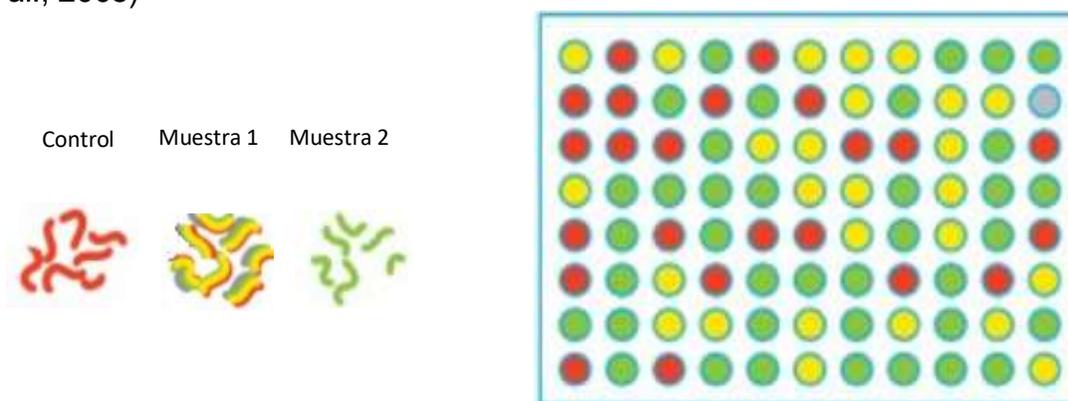


**Figura 2.** Técnica de RT-qPCR. Descripción general de los pasos que proceden para la detección de alguna clase de sncRNA partiendo de la selección de un kit de detección de sncRNA. Durante la poliadenilación en la posición de 3', el cebador de adaptador Oligo dT debe realizar una reacción conjunta para transcribir inversamente a la cadena de sncRNAs poly A. El kit utilizado para esta técnica contiene SYBR®Green que reporta cuantitativamente la expresión de los sncRNAs. (Imagen modificada de: Genecopoeia express to Discovery Inc, 2001-2020; Fisher Scientific Inc, 2015)

### 3.2.2 Microarreglos

En un estudio genómico mediante la técnica de microarreglos comparativos permite detectar diferencias entre diversas condiciones. La técnica de microarreglos se basa en la hibridación de una sonda o una molécula diana en una plataforma solida que se indica generalmente mediante la emisión de fluorescencia, esta permite la cuantificación relativa de la expresión diferencial del genoma de una muestra control y una muestra problema, las cuales son depositadas sobre una matriz. La medición de expresión del gen es por medio de un análisis de imagen (Moreno V, 2004).

Esta técnica consiste en que el RNA se convierte en cDNA mediante una transcriptasa reversa y en este paso se marca con un fluoróforo que emitirá la fluorescencia excitada con una luz de láser. El cDNA marcado que actuará como una sonda, se compone de genes que se expresan en la célula de estudio y estos se hibridaran con las secuencias complementarias contenidas el microarreglo y quedan fijadas en el panel del chip. Posteriormente, el microarray se lava para eliminar las sondas no hibridadas y se mide la cantidad de fluorescencia presente en el chip (Li *et al.*, 2005)



**Figura 3. Esquema de flujo de trabajo para el microarreglos (modificado de Moreno V., 2004).** Se observan dos muestras marcadas con un fluoróforo (sondas) diferentes para cada uno en la que hibridan conjuntamente de manera competitiva con el cDNA diana añadido en un soporte de metálico (microarray). En el microarray se visualiza tres colores diferentes que serán analizados estadísticamente.

La extracción de ácido nucleico perteneciente a cada muestra es marcada con un fluoróforo diferente para poder diferenciarlas y se añade una condición control sin la enfermedad a analizar (Figura 5). La información que proporciona es sobre los genes que varían en la expresión en respuesta a la condición fisiopatológicas.

La técnica de microarreglos permite la cuantificación relativa de la expresión diferencial del genoma de una muestra control y una muestra problema, las cuales son depositadas sobre una matriz. Los microarreglos son muy usados en la investigación principalmente por la flexibilidad de diseño que requiere para la estandarización de las metodologías y permiten el estudio de moléculas blancas. No obstante, la baja reproducibilidad y especificidad hace que se opte por escoger otra técnica en estudios más profundos (Martin *et al.*, 2016).

El análisis de la expresión de los sncRNAs en el embarazo, por medio de esta técnica se ha enfocado en estudios de miRNAs relacionados a temas como son el aborto espontáneo, la preeclampsia y el parto prematuro. En ensayos de microarreglos se pudieron identificar 20 miRNAs que regulan la expresión de genes para las metaloproteinasas (*MMP*), la familia de factores de crecimiento derivados de la placenta (*PAPPA*, *PDGF*) y la señalización de las citocinas (*SOCS1*). Estos genes participan en diferentes actividades de la placenta como ser mediadores de las respuestas proinflamatorias, angiogénicas, recambios de tejidos, crecimiento fetal y placentario. Todos estos procesos biológicos provocan un cambio en la condición celular y fisiológica en el suceso del embarazo (Mayor-Lynn *et al.*, 2011). Dada la importancia de la regulación de los genes participantes en la función de la placenta, estas pueden influir en definir la condición del embarazo y poder predecir aquellas complicaciones relacionada al embarazo.

### 3.2.3 Secuenciación masiva de Nueva Generación (RNA-Seq): Fundamentos y calidad de la muestra

La tecnología del RNA-Seq es una herramienta transcriptómica que está fundamentada en los principios de la secuenciación por el método de Sanger aunado con avances tecnológicos para la secuenciación masiva del genoma. Es una técnica novedosa en el campo de la investigación, principalmente porque permite realizar estudios con los enfoques clínicos, biológicos, aplicados y de aspectos básicos ( Ansorge W. J., 2009).

La secuenciación masiva es un método que se caracteriza por tener un alto rendimiento, profundidad de detección, alta sensibilidad y especificidad y que consiste en tres pasos principales: 1) el aislamiento del RNA, 2) la preparación de la biblioteca y 3) el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas. El RNA total aislado debe cumplir con características primordiales para su uso en una secuenciación, las cuales implica una concentración de RNA que debe ser mínimamente de 10 ng/  $\mu$ L, una pureza que se calcula a partir de una relación de absorbancia 260/280 que debe ser mayor a 1.8 y finalmente una integridad de RNA que es evaluada mediante: 1) la electroforesis en gel de acrilamida que permite obtener bandas definidas y 2) un sistema automatizado llamado bioanalizador Agilent 2100 que permite obtener gráficas visualizadas como “*electroforogramas*” ( Schroeder *et al*, 2006).

La electroforesis en gel se logran obtener dos bandas que usualmente corresponden a RNAs ribosómicos (28S, 18S), dichas bandas se observan de manera subjetiva por lo que se han implementado el uso de otros métodos más automatizados (*Bioanalizador Agilent*) y precisos que proporciona datos a través de picos de lecturas en electroferogramas, que permite medir la integridad del RNA calificada como *RNA Integrity Number* (RIN, siglas en inglés), éste reporta

datos en un rango de 1 a 10, en el que indica si existe material genético degradado o intacto y que dicho valor debería de ser de al menos 7 (Sonntag, K. C., & Woo, T. W., 2018). Es importante mencionar, que la preparación de la biblioteca es un paso primordial para la obtención de secuencias de calidad que son calificados por programas bioinformáticos.

Las plataformas que más se han utilizado para la obtención de secuencias son Illumina, Solexa, ABI SoliD, Ion Torrent Roche 454 (Metzker ML, 2010). Los datos que proporciona la secuenciación son eficientes e innegables, puesto que, se comparan con el genoma completo y es así como se puede cuantificar la expresión de genes, facilitar la identificación de empalmes de genes alternativos y detectar modificaciones postranscripcionales, fusión de genes, mutaciones y de polimorfismos (SNPs) (Nietsch *et al.*, 2016). Esta técnica también se basa en la obtención de perfiles de RNA no codificantes y RNA largos (Ozsolak & Milos, 2010; Wang Z *et al.*, 2011; Zhao K.,1999). Sin embargo, es una técnica sujeta a altos costos por los procedimientos que con lleva su análisis, además, es restringente en la calidad del ácido nucleico respecto a la pureza y a la concentración de las muestras a analizar.

La técnica para la secuenciación comienza cuando las características primordiales del RNA han sido validadas en concentración, pureza e integridad, por lo que prosigue a la construcción de la biblioteca.

### **3.2.3.1 Preparación de la biblioteca y secuenciación por síntesis.**

Las etapas de la preparación de una biblioteca consisten principalmente en 1) una visualización de la cadena de cDNA con los adaptadores validados por el sistema *Agilent Bioanalyzer*, 2) la purificación de la cadena de cDNA, 3) separación cDNA en geles de poliacrilamida o acrilamida 3) la validación de la separación por el sistema *Tape-Station*. Es importante mencionar que

durante la preparación de una biblioteca, esta se tiene que someter a una validación de calidad que consiste en utilizar los sistemas *TapeStation* y *Agilent Bioanalyzer* (Cheng L. *et al.*, 2007). Estos sistemas permiten determinar la correcta preparación de la biblioteca en una secuenciación masiva. Esta comienza cuando el RNA total será unido a adaptadores en los extremos 3' y 5' en el que se ejecutará una transcripción reversa por la aplicación de una RT-PCR, que se convertirá en una cadena de cDNA. La construcción de la biblioteca se convierte en fragmentos de cadenas de cDNA en los tamaños (pares de bases) deseadas a analizar. Para poder definir el tamaño de las secuencias a analizar, es necesario que el sistema *Bioanalyzer Agilent* reporte la cantidad de pares de bases, una vez que se tiene dicho reporte, se da inicio al segundo paso de la secuenciación que es la purificación, ésta consiste en añadirle perlas magnéticas que se adhieren a la cadena de cDNA mediante un campo magnético que la atrae hacia las paredes provocando una inmovilización. La eliminación del campo magnético se lleva a cabo mediante un lavado con una solución que se realiza de manera consecutiva tras añadir las perlas magnéticas. La purificación es un paso importante porque permite seleccionar y purificar el ácido nucleico promoviendo una condición óptima para la preparación de la biblioteca ( Oberacker *et al*, 2019).

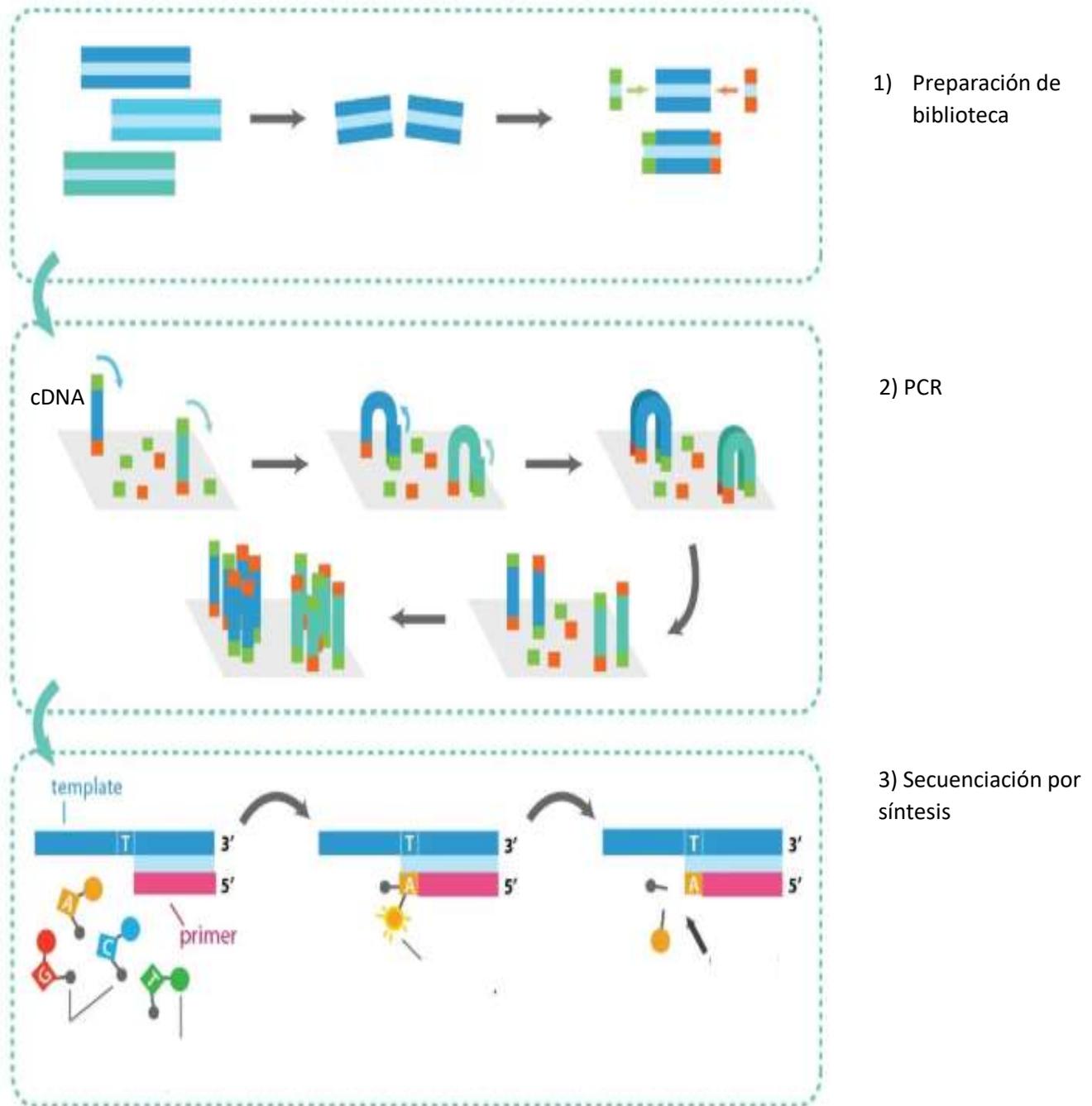
Una vez purificada el cDNA, la separación de los adaptadores y la cadena de cDNA es llevada a cabo por la electroforesis en geles de acrilamida o poliacrilamida, según el seguimiento del protocolo. El último paso conlleva la utilización del sistema *TapeStation* que permite validar la separación del cDNA y los adaptadores. En esta última etapa es importante observar el tamaño de las secuencias pues podría afectar la secuenciación. En otros casos, cuando se desea obtener RNA cortos (<200), se realiza la fragmentación de los RNA largos para que puedan ser adecuados en las plataformas de secuenciación (Chu, Y., & Corey, D. R.,2012).

La secuenciación por síntesis comienza por la agregación de cDNA modificado a la celda de flujo. El cDNA se denomina modificado debido a la adhesión de un adaptador y una etiqueta diferente para cada muestra a analizar. Los oligonucleótidos que son complementarios a los adaptadores se encuentran en la celda de flujo y se van a unir a los adaptadores. Los fragmentos de cDNA que no sean añadidos a un oligonucleótido complementario serán lavados por el mismo sistema. En la que posiblemente coloca una tasa de error durante el procedimiento de secuenciación. La tecnología forma puentes de oligonucleótidos cuando amplifica cada una de las cadenas de cDNA creando grupos de 1000 cadenas idénticas a la original (Podnar *et al.*, 2014). Luego, los cuatro nucleótidos (A, G, C, T) permanecerán modificados porque son etiquetados con un fluoróforo diferente que emitirá una luz cuando sean captados por el láser del secuenciador y serán modificados en el extremo 3' porque se formaran como bloqueadores tras actuar de manera reversible a los nucleótidos de la cadena leída. Posterior a eso el resto de los nucleótidos no unidos a una cadena se lavarán.

Una vez que se realiza la formación de las secuencias, estas se cuantifican respecto con el genoma y las referencias expuestas en base de datos bioinformáticas (Wang Z *et al.*, 2009). El control de calidad de las secuencias evaluadas por secuenciación se realiza mediante programas bioinformáticos que analizan y califican cada una de las lecturas y reportan su calidad asignado un puntaje. Posterior a eso se realiza un mapeo de todas las lecturas a la base de datos de referencia, alineación, clasificación, anotación funcional y análisis bioestadísticos.

En particular, para la secuenciación de los sncRNAs se han establecidos procedimientos preanalíticos y analíticos estandarizados que garantizan la cuantificación correcta de sncRNAs en circulación sanguínea (Mitchell *et al.*, 2008). Dichos procedimientos se llevan a cabo a partir del procesamiento, almacenamiento y ensayos clínicos monitoreados desde la perspectiva del

analista, es decir, que se consideran como el manejo de las muestras, así como la selección del anticoagulante empleado para obtener plasma, la toma de muestra, la existencia de hemolisis y la presencia de metabolitos provenientes. Estos son factores son indicadores relevantes para la determinación de la calidad de la muestra (Cheng *et al.*, 2013; Kukurba & Montgomery, 2015).



**Figura 4. Pasos que implica una secuenciación masiva.** 1) La preparación de la biblioteca consiste en obtener fragmentos con sus adaptadores. 2) PCR para amplificación de la hebra de cDNA. 3) la secuenciación por síntesis en la plataforma de NGS para secuenciar muchas copias idénticas o una sola molécula. (Imagen consultada: <https://www.abmgood.com/Next-Generation-Sequencing-Service.html>)

La estandarización de los ensayos para el manejo de muestras biológicas es importante para la obtención de buenos resultados. Este proceso requiere de procedimientos para tener un buen control de calidad y aprovechamiento de todas las muestras biológicas. En muchas metodologías experimentales basadas en biología molecular recurren a la recuperación del material genético a pesar de las condiciones en las que se procesa, sin embargo, para determinar resultados confiables con un valor reproducible se recomienda tener una concentración cuantificable de RNA. La concentración de material de RNA a partir de la extracción ha sido indicada en un intervalo de (5ng - 2 µg) por µl para la construcción de la biblioteca en la secuenciación (Podnar, Deiderick, Huerta, & Hunicke-Smith, 2014).

Las variables analíticas y preanalíticas en la calidad de la muestra también se ven influenciadas por la imprecisión de los ensayos. Desde la aplicación de la flebotomía, la congelación de la muestra, el tipo de tubo seleccionada para la colecta de muestra y la cantidad de centrifugación son variables importantes por considerar para su estudio por medio de la secuenciación (McDonald *et al.*, 2011).

#### **3.2.4 sncRNAs como biomarcadores en el embarazo.**

Un biomarcador, según la OMS, permite predecir e influenciar en los procesos celulares o biológicos en una célula o tejido del ser humano. Los biomarcadores son moléculas prometedoras para el monitoreo del embarazo, ya que su participación en la regulación de la expresión de genes asociados al proceso de embarazo se ve alterada por cambios en la gestación. Es así que, hacer posible detección de los sncRNAs en la sangre permitiría usarlos

como biomarcadores de diagnóstico o pronósticos de patologías relacionadas al embarazo (Guo *et al.*, 2017).

Una de las clases de los sncRNAs que más se han propuesto como biomarcadores en el embarazo son los miRNAs. El estudio de los miRNAs en la circulación materna permitió entender que existen vías biológicas participantes en algunas patologías relacionadas al embarazo como lo son en la preeclampsia, el parto prematuro y otras en las funciones de la placenta. Dada a que la placenta se está involucrando en el origen de estas moléculas, se están desplegando ideas sobre la caracterización de aquellos miRNAs con origen placentarios, en la cual pueden ser utilizados como biomarcadores (Mouillet *et al*, 2015).

La información sobre la participación de los miRNAs en el embarazo sigue siendo escasa en el área de la investigación a pesar de que existen datos biológicos en bases bioinformáticas como mirBase que contiene información de 2500 miRNAs humanos involucrados en estados patológicos como el cáncer, fibrosis cardiaca, entre otras (Griffiths-Jones S., 2004). Es importante tener los perfiles de miRNAs circulantes que sean propios del embarazo.

La presencia de los miRNAs en la circulación sugiere que además de poder participar en la comunicación fetomaterna, estas también puedan participar en el cambio fisiológico de tejidos locales y lejanos a la placenta y que estén relacionados con el adaptar el cuerpo materno para la gestación. El conocimiento acerca de la presencia de los miRNAs en la circulación plasmática materna permite destacar la presencia de otras clases de sncRNAs con posible origen. placentario (Mouillet *et al*, 2016).

#### 4. Antecedentes

El descubrimiento de la presencia de ácidos nucleicos de origen fetal y/o placentario en la circulación materna durante el embarazo provocó nuevas interrogantes sobre la función específica de estas moléculas en el torrente sanguíneo y su participación como moduladores de los procesos biológicos relacionados con el desarrollo fetal (Lo *et al*, 1997).

Las investigaciones de la medicina y biología perinatal progresaron hacia la búsqueda de nuevos blancos moleculares implicados en el embarazo. Dada la evidencia de la presencia de los miRNAs circulantes en el suero y plasma de mujeres embarazadas, se está proponiendo que exista otras clases de sncRNAs relacionados con el desarrollo de la gestación. La utilización de diferentes técnicas moleculares como la RT-qPCR, microarreglos y actualmente la RNA-Seq, están permitiendo profundizar en el estudio de los sncRNAs circulantes relacionados con el embarazo. Actualmente hay grupos de investigación de países como Japón, China y E.U.A. que ampliaron la búsqueda de sncRNAs por medio de la técnica de secuenciación masiva (Yang *et al.*, 2011).

La secuenciación masiva permitió conocer las clases de sncRNAs circulantes en plasma materno, en el que se demostró la abundancia en los tipos de sncRNAs como los tRNAs, snRNAs y rRNA. De los miRNAs presentes en el embarazo se han reportado aproximadamente 820 miRNAs específicos de placenta, que también se vinculan a complicaciones propias del embarazo (Morales-Prieto *et al.*, 2013).

La presencia de los miRNAs en la circulación materna podría ser considerada como un biomarcador de diagnóstico prenatal no invasivo dado que la expresión de estas moléculas solo puede ser cuantificadas en un intervalo específico de tiempo. Los perfiles de expresión de los

miRNAs entre mujeres embarazadas y no embarazadas han estado mostrando diferencias significativas, es decir, que existen miRNAs que controlan la condición del embarazo.

Debido a lo anterior, a los miRNAs les han dado el papel principal en la regulación de la condición de la gestación, participando también en las complicaciones y/o enfermedades asociadas al embarazo como son el desprendimiento de placenta, la restricción del crecimiento fetal/intrauterino (IUGR/FGR), la diabetes gestacional y la preeclampsia (Liang *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2014; Morales-Prieto *et al.*, 2012).

Los estudios reportan que existen miRNAs circulantes que participan en la modulación de la expresión de genes que regulan las funciones biológicas de la placenta (Cai, Kolluru, & Ahmed, 2017) (**Tabla 1**). Se ha detallado la procedencia de un grupo de miRNAs circulantes a partir de los genes que están ubicados en los cromosomas C19 y C14 (Liang *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2014; Morales-Prieto *et al.*, 2012), éstas han sido las más estudiadas debido a que han demostrado su participación y permanencia en el primer y tercer trimestre del embarazo. Su contribución ha sido relacionada con el desarrollo de la neurogénesis, el desarrollo embrionario de cabeza y tronco, desarrollo de placenta, la regulación de transcripcional y las actividades de las células trofoblástica (Morales-Prieto *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** miRNAs circulantes en el embarazo con su función placentaria y complicaciones.

| miRNAs   | 1° Trimestre | 2° Trimestre | 3° Trimestre | Complicación/Función relacionada al embarazo  | Referencia                            |
|--|--------------|--------------|--------------|---|---------------------------------------|
| C14MC clúster  | +++          | +            | +            | -Desarrollo de células embrionarias.<br>- Regulación transcripcional.   | (Morales-Prieto <i>et al.</i> , 2013) |
| C19MC clúster  | +            | +            | +++          | -Desarrollo de células madres embrionarias.<br>-Adaptación y diferenciación de las células del trofoblasto.                                   | (Donker <i>et al.</i> , 2012)         |
| Clúster miR-517  | ++           | ++           | ++           | -Expresada en el tejido del trofoblasto<br>-Reducen la invasión celular por medio de la regulación de los genes HOXA5, SEMA3A, TFAP2B y PTK2B | (Ventura, 2013)                       |
| miR-135b   | +            | +            | +            | - Regulador positivo de proliferación celular:<br>- Regulación a la baja en placentas de mujeres con preeclampsia.                            | (Tamaru <i>et al.</i> , 2019)         |
| miR-210, miR-155, miR-181a, miR-182 miR-200b, miR-29a, miR-183 | +            | +            | +            | -Preeclampsia   | (Zhu, 2009; Li, 2013)                 |
| miR-518b   | +            | +            | +            | Potencia proliferación celular en trofoblasto por medio de Rab1 y vía Ras-MAPK  | (Miura <i>et al.</i> , 2014)          |
| miR-519d   | ++           | +            | +            | - Migración celular<br>- Invasión<br>- Proliferación de las células del trofoblasto.  | (Ehman <i>et al.</i> , 2017)          |

+ Menos presente; ++ Presente; +++ Muy presente. La presente tabla reporta los miRNAs que se encuentran relacionados entre diferentes grupos de investigación. Cada uno de los miRNAs están vinculados con procesos especiales del embarazo.

La secreción de los miRNAs lo han descrito proveniente de la placenta hacia el torrente sanguíneo materno es liberado por medio de los exosomas derivados del trofoblasto vellos (Luo *et al.*, 2009). La liberación de los miRNAs está regulada por factores genéticos, ambientales y fisiológicos que influyen en la condición y desarrollo del embarazo (Qiu C *et al.*, 2012).

Por otra parte, la placenta y el útero son los principales órganos participantes para el mantenimiento del embarazo. La placenta es un órgano transitorio que se desarrolla a partir del embrión e invade los tejidos maternos para conectarlos con el feto. La supervivencia, el desarrollo y el crecimiento del feto son las actividades principales que desempeña la placenta, dada su función en el embarazo, ésta promueve el transporte de los ácidos nucleicos circulantes. Por lo es que tiene un papel importante en el estudio de los sncRNAs circulantes.

Teniendo en cuenta la presencia de los miRNAs en la circulación y dado a que están siendo implicadas en el desarrollo placentario, se propusieron como un biomarcador de diagnóstico no invasivo debido a que se identificaron con un cambio de cantidad y especificidad de los miRNAs circulantes (Chim *et al.*, 2008; Kotlabova *et al.*, 2011; Mouillet *et al.*, 2016). No obstante, se desconoce el papel que tienen otros tipos de sncRNAs en la circulación materna como son: tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA y piRNA (Miura *et al.*, 2017) (Murakami, 2018). Por otra parte, la circulación de una variedad de sncRNAs en el plasma materno también pueden verse implicadas en la función de la placenta y en el crecimiento fetal, sin embargo, en otras investigaciones siguen sin describir su papel en el embarazo.

Para lograr estudiar las clases de sncRNAs en plasma de mujeres embarazadas es necesaria la toma de muestra adecuada durante su condición perinatal. La NOM-007-SSA2-1993 menciona a cerca de la atención a la mujer embarazada y determina que la toma de muestra sanguínea por consulta gineco-obstétrica es en un volumen máximo 10 ml de sangre. Para el

estudio de los sncRNAs la cantidad de muestras es un factor determinante debido a la poca cantidad de muestra sanguínea y por lo tanto restringe el estudio de los sncRNAs en plasma a causa de la que es necesario la aplicación de una técnica molecular y en la que se deben de cumplir con criterios indispensables para su uso en la metodología. La presencia de estas moléculas en la circulación materna abre la indagación para la profundidad de su estudio.

## **5. Objetivo General**

Identificar las abundancias de los sncRNAs circulantes en plasma durante el progreso de la gestación en cuatro mujeres embarazadas sanas a través de una secuenciación masiva.

## **6. Objetivos Particulares**

- a) Seleccionar a los sujetos de estudios durante el desarrollo de una cohorte perinatal.
- b) Estandarizar la metodología para RNA-Seq con baja concentración de material genético circulante.
- c) Analizar la abundancia de los sncRNAs circulantes en distintos periodos del embarazo con el mismo sujeto de estudio

## **7. Hipótesis**

En la mujer embarazada la gestación influye en la abundancia relativa de los sncRNAs circulantes y su cambio se relaciona con el trimestre gestacional.

## **8. Planteamiento del problema**

La presencia de ácidos nucleicos libres provenientes de la placenta en el torrente sanguíneo materno ha abierto una nueva línea de investigación sobre su participación en el embarazo y la relación que guardan respecto al estado de salud del feto. A su vez, se desconoce la razón fisiológica por la cual la placenta secreta estos ácidos nucleicos.

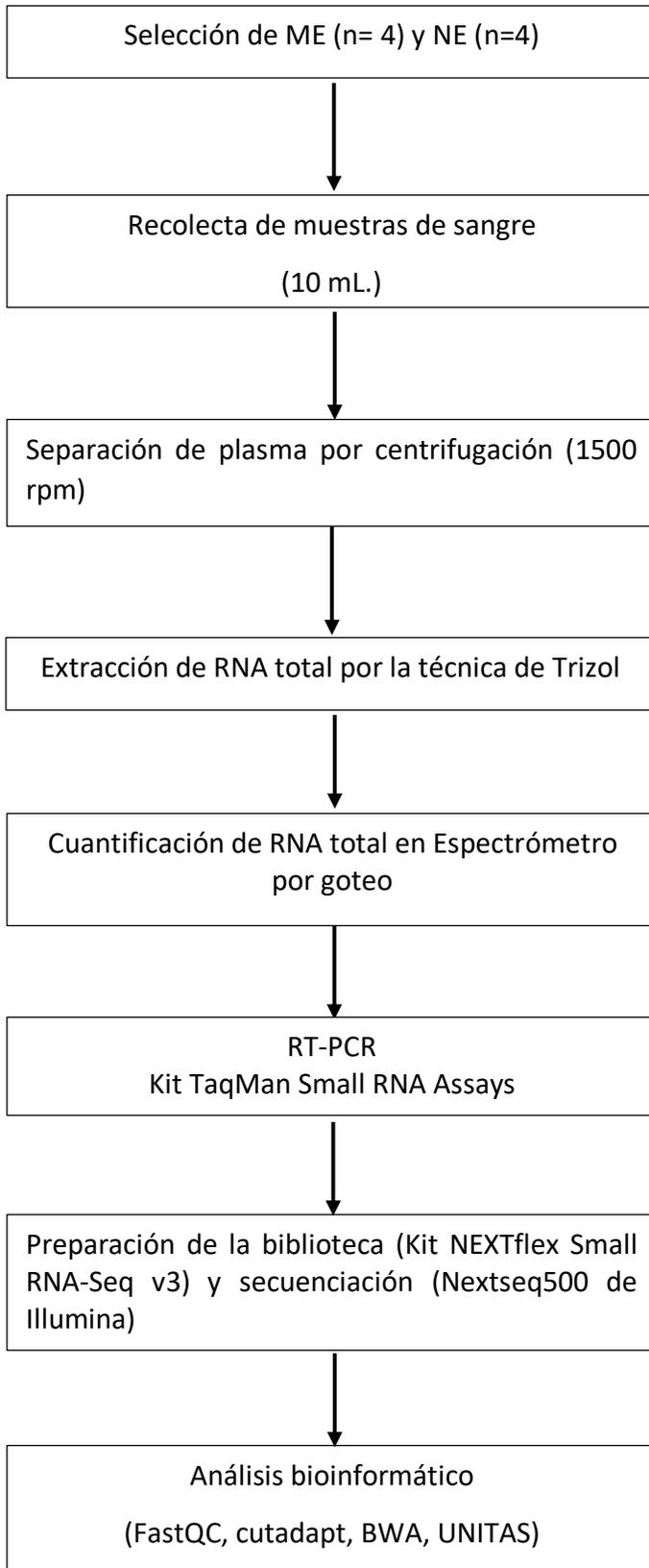
Para identificar la abundancia de los sncRNAs en circulación se requiere de técnicas moleculares con alta sensibilidad como es la secuenciación masiva. No obstante, la cantidad inicial de muestra de RNA total para realizar la RNA-seq es un paso limitante si no se cuenta con el suficiente material genético. Varios de los grupos de investigación que han utilizado esta técnica para caracterizar las clases de sncRNAs presentes en muestras de suero o plasma, lo han realizado a partir de la mezcla de muestras de distintos sujetos con las mismas condiciones controles o experimentales. Sin embargo, la variabilidad genética junto con los hábitos individuales son factores que pudieran generar sesgos en los resultados.

La NOM-007-SSA2-2016 indica que sólo se puede coleccionar 10 mL de sangre a cada mujer embarazada, situación que restringe la cantidad de material genético suficiente individual para mandar a secuenciar. Esta razón nos obliga a la estandarización y desarrollo de nuestra propia metodología desde la colecta de muestra sanguínea en el Hospital Público General, el procesamiento de la misma para el aislamiento del RNA total hasta la verificación en la calidad de la secuenciación.

## **9. Justificación.**

Probar una condición metodológica diferente para la identificación de los sncRNAs circulantes maternos para determinar su abundancia con relación al progreso del embarazo. La información que es inexistente tanto para nuestra población mexicana, como para el seguimiento del embarazo restringe del conocimiento acerca de su participación biológica y la regulación de estas. Los resultados serán utilizados para ser comparados con las de otras poblaciones de mujeres embarazadas y tratar de explicar su participación en eventos primordiales de la gestación. No obstante, este trabajo contribuirá con evidencias metodológicas para el uso alternativo de la técnica a partir de muestras sanguíneas de un mismo individuo.

## 10. Metodología.



## 10.1 Sujetos de estudios

A partir de una cohorte perinatal del Hospital General “Dr. Enrique Cabrera” de la Secretaría de Salud del Gobierno de la Ciudad de México (SEDESA; No. de registro 210/010/31/17), se seleccionaron a cuatro mujeres en condición de embarazo (ME) normo-evolutivo y metabólicamente sanas para ser partícipes, mediante carta de consentimiento informado en este proyecto de investigación registrado en el INMEGEN (07/2018/I) y en la Facultad de Medicina, UNAM (FM/DI/SR/123/2018).

Los criterios de inclusión considerados para esta tesis fueron que las mujeres embarazadas tuvieran 19 a 35 años, con producto único y que llegarán a término. Además, que éstas hayan sido reclutadas desde el primer trimestre de embarazo, teniendo datos completos de sus pruebas bioquímicas clínicas con niveles normales de acuerdo con cada trimestre del embarazo y que se hayan presentado a una consulta ginecobstétrica al menos 15 días después del parto (D.E.).

Los criterios de exclusión fueron la presencia de preeclampsia, hemorragias durante el embarazo, diabetes *mellitus* o gestacional, indicadores de sufrimiento fetal, parto pretérmino, infecciones recurrentes, aborto, desnutrición y valores disminuidos en los resultados de cada trimestre del embarazo respecto a los estudios de las bioquímicas sanguíneas.

Los criterios de eliminación incluyeron a las mujeres que se dieron de baja del estudio o que no asistieron a una consulta por trimestre del embarazo y/o después del parto.

Como sujetos controles, se reclutaron a cuatro mujeres no embarazadas (NE) del Instituto Nacional de Medicina Genómica para la toma de muestra sanguínea y de datos generales, bajo previo consentimiento informado. Los criterios de inclusión para estas mujeres fueron que tuvieran entre 20 a 35 años y que sus resultados de las pruebas bioquímicas fueran normales de acuerdo con las referencias poblacionales (Chamberlain G. & Broughton P.,1998; INP, 2018).

Los criterios de exclusión fueron la obtención de los parámetros bioquímicos anormales, un índice de masa corporal bajo, enfermedades previas, alergias y/o embarazo recién terminado, desnutrición y problemas metabólicos. Finalmente, el criterio de eliminación contemplado fue el que la mujer no se presentara a la toma de muestra.

### **10.2 Colecta de muestra sanguínea periférica.**

Las muestras biológicas de sangre fueron colectadas a las 8:00 am en condiciones de ayuno, utilizando tubos Vacutainer con Gel y activador de coagulación y EDTA K<sub>2</sub> (367955; 367863/ Becton Dickinson). Las muestras fueron trasladadas en hielo o refrigerantes al laboratorio en donde se les realizó la separación de la fracción del plasma de la siguiente forma: cada uno de los tubos con 10 mL de sangre fueron centrifugados a 1,500 x g (Centrifuga D-37520, 120 VAC, Thermo Fisher Scientific) por 10 min a temperatura ambiente y 2 mL del plasma fue almacenado en criotubos libres de RNAsas a -80°C en el ultracongelador para su posterior procesamiento.

### **10.3 Extracción de RNA total en las muestras de sangre.**

A partir de los 2 ml de plasma se extrajo el RNA total con Trizol, utilizando el procedimiento establecido por el proveedor (15596029, Invitrogen). Brevemente, las muestras de plasma fueron completamente mezcladas con el reactivo de Trizol frío (1:3) en tubos de polipropileno. Posteriormente, se les añadió 0.2 mL de cloroformo-ácido por 1 mL de Trizol utilizado para la lisis y se mezclaron vigorosamente para dejar en incubación con hielo por 15 minutos. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. La fase acuosa con el RNA total se recuperó en tubos libres de RNAsas. La precipitación del RNA se llevó a cabo mediante la adición de un volumen de 0.5 mL de isopropanol por 1 mL de Trizol usado en

la fase inicial (1:3), dejándolo toda la noche a -20 °C. La colecta del pellet del RNA precipitado se obtuvo después de la centrifugación durante 10 minutos a 12,000 x g a 4°C, desechando el sobrenadante. El pellet fue resuspendida en 1 ml de etanol al 75% por el volumen de Trizol utilizado en la fase inicial (1:3), mezclando y después fue centrifugada a 7500 x g a 4°C por 5 min, desechando el sobrenadante. Al final, el pellet fue resuspendida con 10 µL de solución agua libre de RNAsas. La extracción de RNA de las muestras se realizo en el laboratorio del Consorcio de Metabolismo de RNA y Vesículas extracelulares del INMEGEN.

#### **10.4 Cuantificación de RNA total.**

El RNA total fue cuantificado mediante espectrofotometría por goteo (NanoDrop 2000c; Thermo Fisher Scientific), utilizando una doble cuantificación de 1 µL en cada medición para obtener el promedio. La cantidad de material genético solicitado para poder secuenciarlo fue de 50 ng totales con lecturas de pureza (A 260/280 nm) de 1.7 a 2.

#### **10.5 RT-PCR**

En la reacción de la cadena de polimerasa se realizo una transcripción reversa del RNA a cDNA, la cantidad de RNA se determinó a partir de la extracción de RNA que se definió en 7 µL y se añadió 2 µL de agua. Para realizar las reacciones se basaron en el protocolo Taqman Small RNA Assay (Applied Biosystem, 4364031E). Para la preparación de la RT se combinaron en un tubo de polipropileno 3 µL de cebador 5X RT y 5 µL de la plantilla bicatenaria. La reacción de RT se combinará con el RT master mix que contiene dNTPs, buffer transcripción reversa 10X, transcriptasa reversa MultiScribe™ 50 U/µL, inhibidor RNAsa 20 U/µLy agua libre de nucleasa, se mezclaran de acuerdo a la siguiente dilución 7 µL RT master mix:8 µL RNA desnaturalizado y RT primer. La amplificación por qPCR se realizo por 120 minutos mezclando los reactivos del

qPCR master mix que contiene Taqman small RNA assay 20X, RT, master mix universal TaqMan 2X y agua libre de nucleasa con el producto de la reacción RT. Las condiciones del termociclador fueron de 40 ciclos con una denaturalización de 15 segundos a 95°C y alineación y extensión de 60 segundos a 60°C y una activación de la enzima por 10 minutos a 95°C. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software DataAssist™ de Applied Biosystem. ([www.appliedbiosystems.com/dataassist](http://www.appliedbiosystems.com/dataassist))

### **10.6 Secuenciación de RNAs de cadena corta.**

Las bibliotecas de sncRNAs para la secuenciación por medio de la plataforma de Illumina, fueron generadas siguiendo las especificaciones de manufactura del kit NEXTflex Small RNA-Seq v3 (Bioo Scientific). Brevemente, el procedimiento consistió en añadir adaptadores en los extremos 3' y 5' de la cadena de RNA y posteriormente convertirla a DNA complementario (cDNA). Se usaron 25 ciclos de RT-PCR para todas las muestras. Los productos de PCR se purificaron con perlas magnéticas y se seleccionaron los tamaños en geles de poliacrilamida al 6%. La selección de los tamaños fue hasta 150 pb y se analizó la calidad en la preparación de una biblioteca por TapeStation de Agilent Technologies. La concentración de las muestras se determinó por Qubit. Para detectar individualmente cada una de las muestras, durante la construcción de la biblioteca se añadieron barcodes que funcionan como etiquetas conocidas que sirven como símbolo de identificación. Posterior a eso se realizó una mezcla de todas las muestras en una concentración de 12pM para añadir al secuenciador Illumina RNAseq (150 ciclos, lectura única). La construcción de las bibliotecas y secuenciación se realizó en la Unidad de Secuenciación del INMEGEN.

## 10.7 Análisis bioinformático

Los datos de secuenciación fueron almacenados en la nube del servidor del INMEGEN y posteriormente se evaluó la calidad de las secuencias obtenidas a través del programa de FastQC. El programa de FastQC reporta la calidad de las secuencias obtenidas basada en un score phred (P), dicho puntaje determina la probabilidad de error durante la secuenciación calculada logarítmicamente, es decir, se califica de acuerdo a estos criterios: 1)  $P > 30$  = Buena calidad; mostrando una probabilidad de error de 1 en 1000 nucleótidos = 99.9% precisión; 2)  $P > 20$  = Calidad aceptable; mostrando una probabilidad de error de 1 en 100 nucleótidos = 99% precisión 3)  $P < 20$  = Calidad mala; mostrando una probabilidad de error 1 en 10 nucleótidos = 90% precisión (Babraham Institute, 2019). Al pasar el control de calidad, se eliminaron los adaptadores de los extremos 3' y 5' en las secuencias obtenidas, utilizando el programa de Cutadapt v.1.10 (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>). Las lecturas sin los adaptadores fueron utilizadas para realizar los alineamientos y mapear a éstas junto con otras lecturas de sncRNAs previamente reportadas, usando el programa de BWA v.0.7.12 (Li & Durbin, 2010) contra el genoma humano (Hg38p12), el programa de UNITAS V2.0 permite mantener las secuencias de anotación basadas en la base de datos de Ensembl release 96 (EMBL-EBI; Gebert *et al.* BMC Genomics, 2017). El análisis bioinformático se llevó a cabo en el Consorcio de Metabolismo de RNA y Vesículas Extracelulares.

## 11. Resultados

### 11.1 Características de los sujetos de estudio.

Las ME y NE seleccionadas para esta tesis corresponden a una población mexicana-mestiza con edad reproductiva y de tallas y pesos similares. No obstante, la condición socioeconómica de las mujeres ME fue menor que las NE con base en sus datos de escolaridad, estado civil y ocupación (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2.** Características antropométricas y socioeconómicas en mujeres embarazadas

| <b>Antropométricas</b>         |                    |               |
|--------------------------------|--------------------|---------------|
| <b>Variable</b>                | <b>Medias ± DE</b> | <b>IC 95%</b> |
| <b>Edad (años)</b>             | 26 ± 6             | 20-32         |
| <b>Peso (kg)</b>               | 53 ± 6             | 47-59         |
| <b>Talla (cm)</b>              | 156 ± 5            | 151-161       |
| <b>IMCp (kg/m<sup>2</sup>)</b> | 23 ± 4             | 19-25         |
| <b>SDG</b>                     | 10 ± 3             | 7 – 14        |
| <b>Socioeconómicas</b>         |                    |               |
| <b>Raza</b>                    | Mestiza            |               |
| <b>Escolaridad</b>             | P > (100)          |               |
| <b>Estado civil</b>            | C (100)            |               |
| <b>Ocupación</b>               | EA (50); ENA (50)  |               |

Datos de cuatro mujeres embarazadas seleccionadas de una cohorte perinatal en la CDMX durante el inicio del estudio. P: preparatoria y/o carrera técnica; EA: Económicamente activas; ENA: Económicamente no activas; S: Soltera; C: casada o unión libre.

**Tabla 3.** Características antropométricas y socioeconómicas de mujeres no embarazadas

| <b>Antropométricas</b> |                    |                |
|------------------------|--------------------|----------------|
| <b>Variable</b>        | <b>Medias ± DE</b> | <b>IC 95%</b>  |
| <b>Edad (años)</b>     | 26 ± 6             | <b>20-32</b>   |
| <b>Peso (kg)</b>       | 61 ± 3             | <b>58 – 64</b> |

|                                 |                 |                |
|---------------------------------|-----------------|----------------|
| <b>Talla (m)</b>                | 156 ± 3         | <b>153-159</b> |
| <b>IMC (kg / m<sup>2</sup>)</b> | 25 ± 1          | <b>24-26</b>   |
| <b>Socioeconómicas</b>          |                 |                |
| <b>Raza</b>                     | <b>Mestiza</b>  |                |
| <b>Escolaridad</b>              | <b>≥P (100)</b> |                |
| <b>Estado civil</b>             | <b>S (100)</b>  |                |
| <b>Ocupación</b>                | <b>EA (100)</b> |                |

Datos de cuatro mujeres no embarazadas de la CDMX. P: preparatoria; S: soltera; EA: económicamente activa.

Para comprobar que las ME se encontraban en un estado saludable durante su embarazo, se evaluaron datos clínicos (**Tabla 4**) y bioquímicos (**Tabla 5**) en cada trimestre del embarazo encontrando que, las cuatro ME tuvieron parámetros normales con base en las referencias descritas para la mujer mexicana embarazada (INP, 2018). Es importante señalar que una de las cuatro mujeres PP presentó valores de TAG y LDL mayores a lo recomendado (Chamberlain G., Broughton P., 1998) (**Tabla 5**).

**Tabla 4.** Características clínicas durante y después del embarazo.

|                        | <b>1° T</b>         | <b>2° T</b>           | <b>3° T</b>         | <b>PP</b>       |
|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|
| <b>Características</b> | <b>(10 ± 3 SDG)</b> | <b>(21.3 ± 2 SDG)</b> | <b>(32 ± 1 SDG)</b> | <b>(≥ 15 D)</b> |

|  |                  |         |                  |         |                  |         |                  |       |
|--|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|-------|
| <b>Peso (kg)</b>                                     | 57 ± 8           |         | 59 ± 5           |         | 62 ± 4           |         | 55 ± 6           |       |
| <b>Ganancia de peso gestacional<sup>1</sup> (kg)</b> | 2.75±5           | 2.4±4.7 | 4.4 ± 3          | 6.3±3.5 | 7.3 ± 5          | 4.9±3.4 | NA               |       |
| <b>Presión sistólica<sup>2</sup> (mmHg)</b>          | 110 <sup>2</sup> | 113±12  | 115 <sup>2</sup> | 102±6   | 116 <sup>2</sup> | 114±18  | 110 <sup>2</sup> | 103±7 |
| <b>Presión diastólica<sup>2</sup> (mmHg)</b>         | 55 <sup>2</sup>  | 70±1    | 69 <sup>2</sup>  | 66±15   | 70 <sup>2</sup>  | 70±10   | 60 <sup>2</sup>  | 63±72 |

Datos de cuatro mujeres embarazadas en la CMX mostrados como medias ± DE. D: días; NA: no aplica; PP: post parto; SDG: semana de gestación; T: trimestre.<sup>1</sup> Siega-Riz et al. 2003. J Reprod Med. 48: 217–24;  
<sup>2</sup>Chamberlain G., Broughton P. (1998).

**Tabla 5.** Características bioquímicas durante y después del embarazo.

| Analito<br>(mg/dL) | 1° T<br>(10 ± 3 SDG) |          | 2° T<br>(21.3 ± 2 SDG) |          | 3° T<br>(32 ± 1 SDG) |          | PP<br>(≥ 15 D) |           |
|--------------------|----------------------|----------|------------------------|----------|----------------------|----------|----------------|-----------|
|                    |                      |          |                        |          |                      |          |                |           |
| <b>Gluc</b>        | 60 -105              | 71 ± 2   | 70-110                 | 71 ± 5   | 70-110               | 66 ± 6   | 75-100         | 76 ± 6    |
| <b>CT</b>          | 141-210              | 172± 24  | 176-299                | 197 ± 46 | 176-299              | 220 ± 36 | < 200          | 196 ± 32  |
| <b>TAG</b>         | 40 – 159             | 160 ± 34 | 75 – 382               | 212 ± 13 | 75 -382              | 261 ± 79 | <150           | 203 ± 127 |
| <b>LDL</b>         | 60 – 153             | 100 ± 22 | 77 – 184               | 128 ± 20 | 77-184               | 119 ± 15 | < 100          | 144 ± 25  |
| <b>HDL</b>         | 40 – 78              | 56 ± 5   | 52 – 87                | 75 ± 29  | 52 – 87              | 63 ± 16  | 40-60          | 45 ± 7    |

Datos de cuatro mujeres embarazadas en la CDMX mostrados como medias ± DE (columnas blancas). CT: colesterol total; Gluc: glucosa; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; TAG: Triacilglicéridos; SDG: semanas de gestación. Referencias (columnas grises): (Abbassi-Ghanavati & Cunningham, 2009).

De la misma forma, las NE se ubicaron dentro de los parámetros bioquímicos normales a lo recomendado (**Tabla 6**) (Marshall et al, 2013).

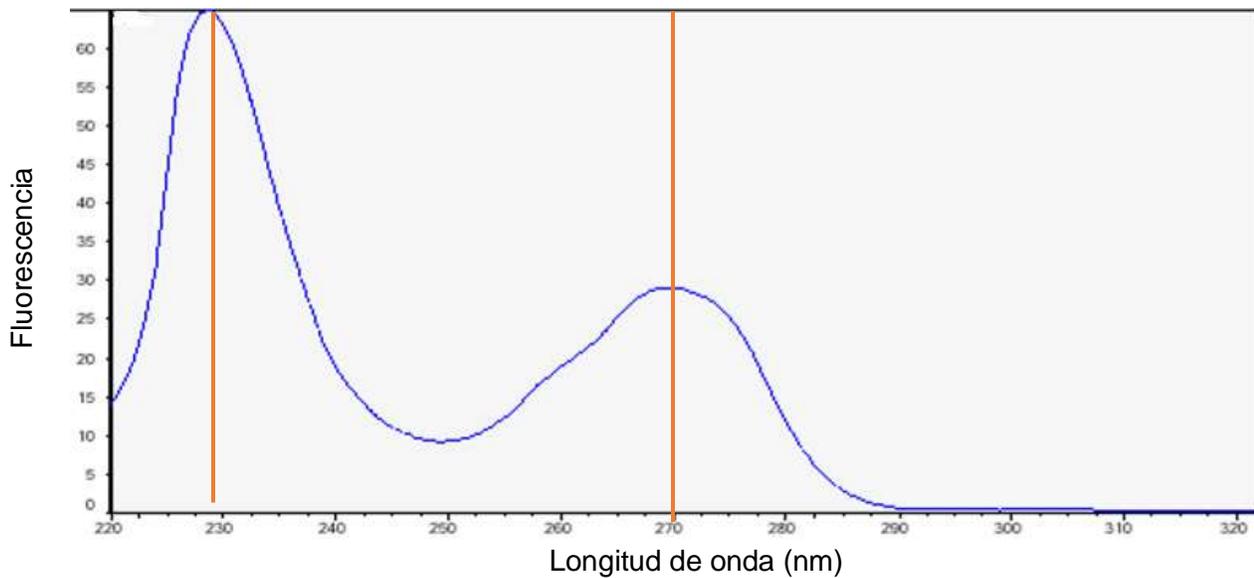
**Tabla 6.** Características bioquímicas en mujeres no embarazadas.

| <b>Analito</b><br><b>(mg/dL)</b> | <b>Valores de referencia</b><br><b>(mg/dL)</b> | <b>Media ± D.E.</b> |
|----------------------------------|--|---------------------|
| <b>Gluc</b>                      | 75-100   | 79 ± 5              |
| <b>TAG</b>                       | < 150  | 119 ± 46            |
| <b>CT</b>                        | 150-220  | 178 ± 29            |
| <b>LDL</b>                       | < 130  | 113 ± 22            |
| <b>HDL</b>                       | 40 - 60  | 47 ± 8              |

Datos de cuatro mujeres en la CDMX. CT: colesterol total; Gluc: glucosa; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; TAG: Triacilglicéridos. Valores de referencias: (Marshall et al, 2013).

## 11.2 Calidad en las muestras de RNA total y su cuantificación

La concentración y la pureza de los ácidos nucleicos es un paso determinante para continuar con la secuenciación del material genético. Si no se cumple con la cantidad de 50 ng de RNA total y un rango de pureza entre 1.7 a 2 por muestra, la Unidad de Alta Tecnología de Secuenciación en el INMEGEN no continua con el proceso. Debido a esto, las muestras se cuantificaron por espectrofotometría por goteo, observando dos picos de absorbancia entre 230 y 270 nm y una concentración promedio de 739.4 ng/μL además de haber obtenido una pureza relativa (260/280) de 1.59 (**Figura 7**).



**Figura 7. Evaluación de la pureza y la concentración por espectrofotometría por goteo de una muestra representativa de RNA total en plasma antes de la preparación de la biblioteca.** Los picos de absorbanza (230 nm y 270 nm) señalizados con líneas anaranjadas muestran contaminación proteica y del solvente enol. nm= longitud de onda NanoDrop 2000c (Applied Biosystem).

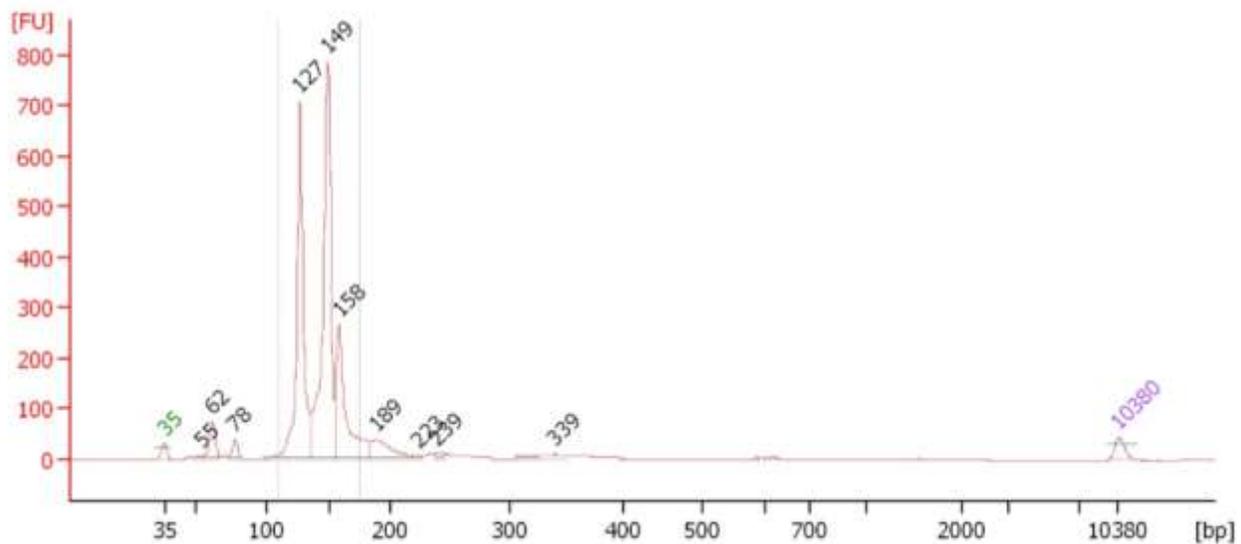
Debido a que no se contó con la concentración y la pureza requerida para secuenciar el RNA total en plasma, se decidió una estrategia que podía indicar si existía material genético, por lo que se realizó una reacción de transcripción reversa usando el Kit de miRNA Taqman®. (n° 4366596, Applied Biosystem). Se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar U6 y mir-16; miRNAs presentes en el plasma (Wang et al., 2012)(Savelyeva et al., 2017). Los resultados fueron positivos para la amplificación de ambos miRNAs, demostrando con ello que era viable poder mandar a secuenciar las muestras de RNA total de las ME y NE a pesar de no contar con las concentraciones y purzas solicitadas (datos no mostrados por su realización en la colaboración con el grupo de metabolismo de RNA y vesículas extracelulares).

### 11.3 Controles de calidad en cada etapa de la generación de la biblioteca para RNA-seq

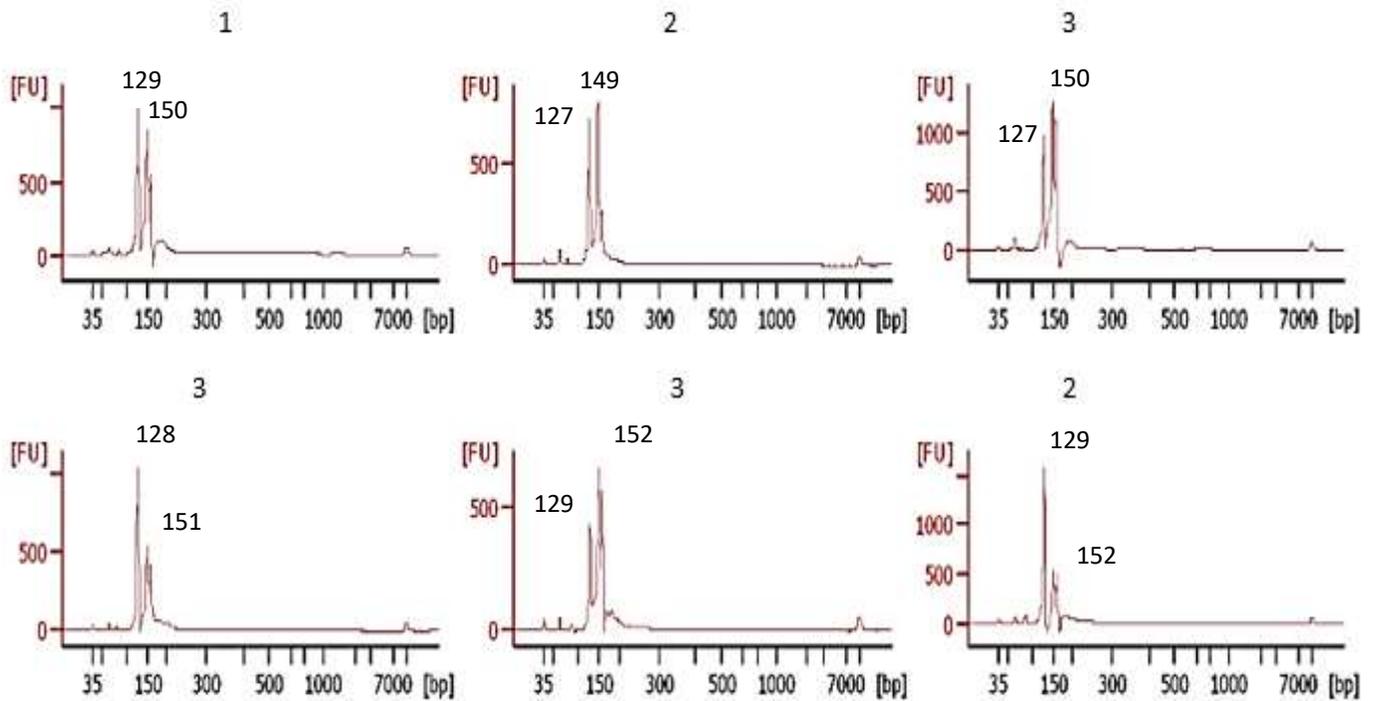
La primera etapa del RNAseq comienza con la preparación de una biblioteca, a partir de la adición de los adaptadores específicos que deben ser unidos a la molécula de RNA en sus extremos 3' y 5'. Ensamblados los adaptadores, se realiza una RT-qPCR ajustando los ciclos de amplificación. Para el caso particular de nuestras muestras, se realizaron 25 ciclos de amplificación.

La primera evaluación en el control de calidad para asegurar que el tamaño e integridad del cDNA (21 - 23 pb) correspondía con el tamaño de los sncRNAs circulantes junto con el tamaño de los adaptadores (148 -152 pb), mostró valores adecuados con los esperados (**Figura 8A y 8B**).

A

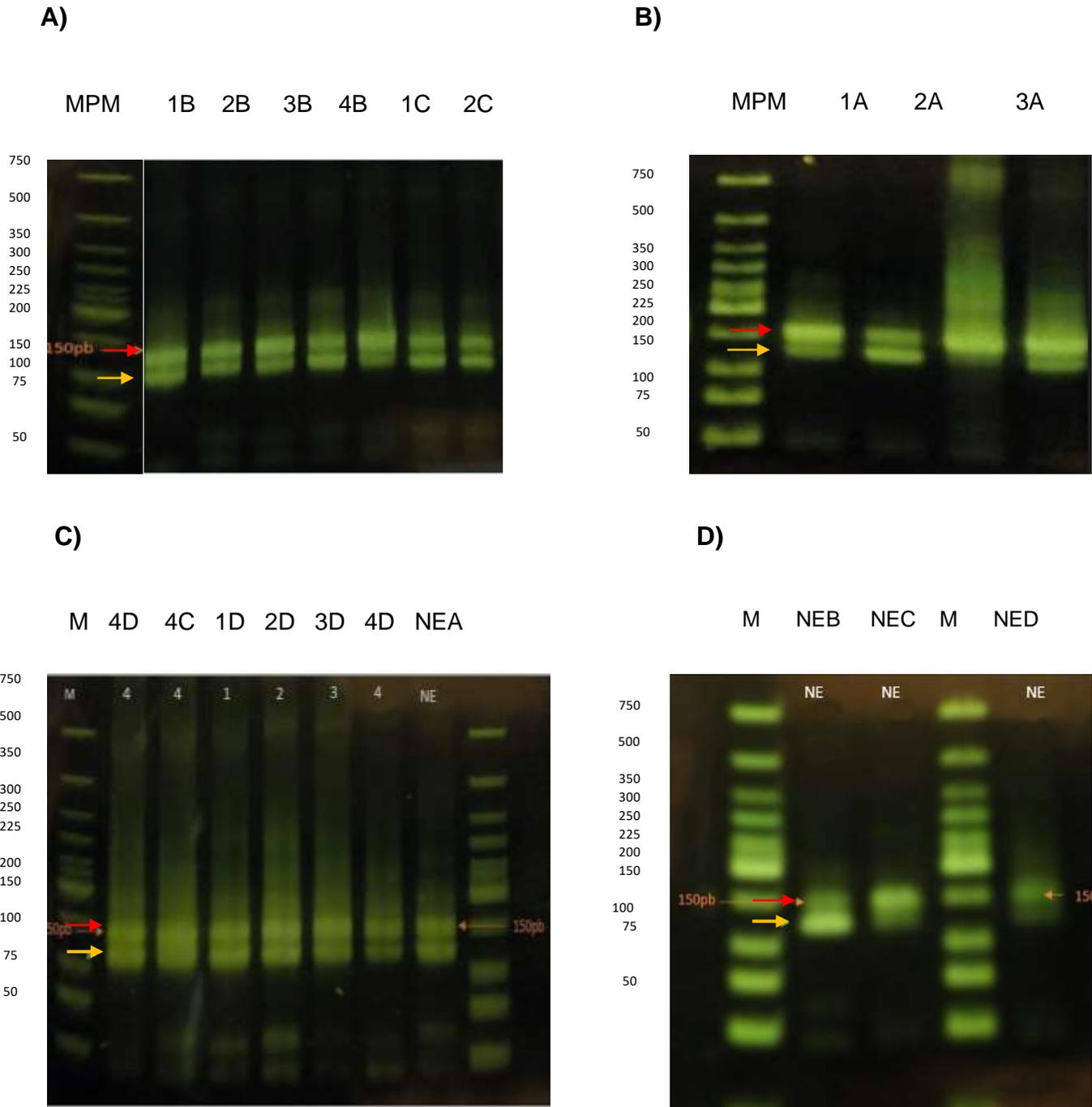


**B**



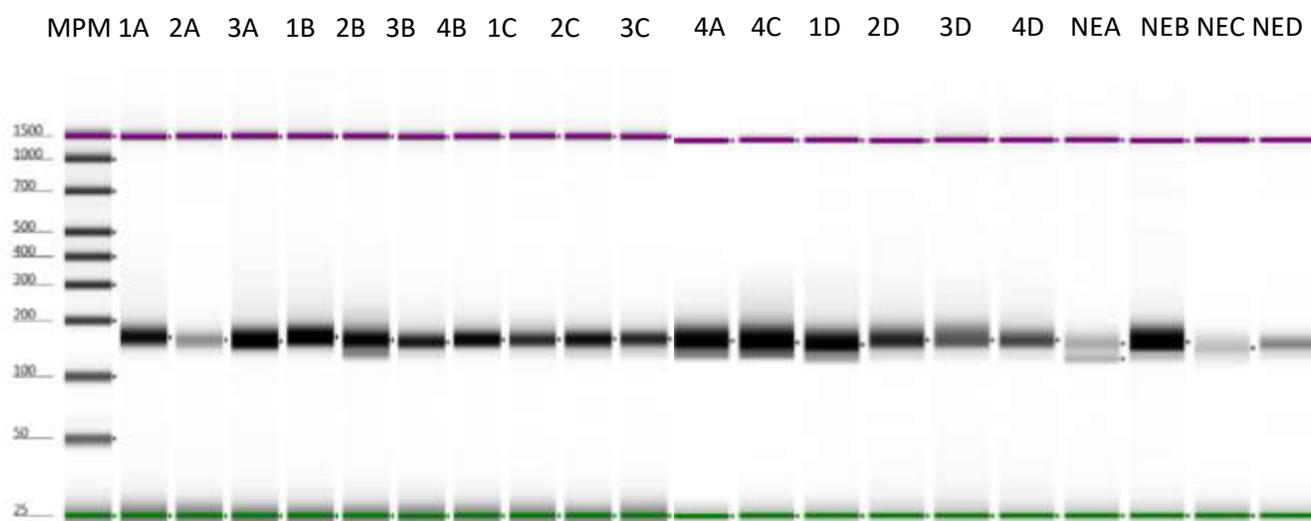
**Figura 8. Control de calidad por bioanalizador para la verificación del tamaño de los adaptadores y cDNA.** Muestras representativas de las lecturas del sistema bioanalizador representado en dos picos que refieren el adaptador (~129pb) y el cDNA (~22pb). A) cDNA de una muestra. B) Seis muestras de ME y/o NE seleccionadas de forma aleatorizada. [FU]: Fluorescencia; [bp]: pares de bases.

El segundo control de calidad se realizó mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en donde se corroboraron los tamaños e integridades de las moléculas correspondientes (Figura 9).



**Figura 9. Control de calidad por electroforesis para la verificación del tamaño e integridad de los adaptadores y cDNA.** Muestras de cDNA (129 pb; flecha roja) y sus adaptadores (150 pb; flecha amarilla) en geles de poliacrilamida al 6%. Letras A-D son muestras de mujeres embarazadas; los números 1-3 son de cada trimestre de embarazo y el 4 después del embarazo. NE: mujeres no embarazadas.

El último control de calidad necesario para el cumplimiento de los requisitos de tamaño, integridad y concentración en los fragmentos de cDNA y para poder secuenciarlos a través de la plataforma de Illumina, fue validado por medio del sistema de electroforesis automatizado (TapeStation). Los cDNAs obtenidos en la biblioteca cumplieron con los tres requisitos (**Figura 10 y Tabla 7**). Es importante mencionar que las concentraciones de los cDNAs fueron mayores a 12 pM; excepto para los cDNAs de las muestras 2A y NEA (**Tabla 7**). Sin embargo, todas las muestras de cDNAs cumplieron con los estándares de calidad prosiguiendo con su secuenciación.



**Figura 10. Último control de calidad por “TapeStation” para la verificación del tamaño, integridad y concentración de los cDNAs.** Las bandas negras corresponden a fragmentos de 150 pb de cDNA íntegro y sin rasgos de degradación. Los números mostrados arriba de cada pozo representan el trimestre del embarazo y las diferentes letras son los sujetos de estudio. MPM: marcador de peso molecular; NE: mujeres no embarazadas

**Tabla 7.** Concentraciones de los cDNAs obtenidas en la biblioteca previas a la secuenciación

| #<br>Muestra   | Concentración<br>[ng/μl] | [nM] | #<br>Muestra | Concentración<br>[ng/μl] | [nM] |
|----------------|--------------------------|------|--------------|--------------------------|------|
| 1 <sup>a</sup> | 2.8                      | 25   | 3C           | 1.83                     | 17   |
| 2 <sup>a</sup> | 1.13                     | 10   | 4C           | 28                       | 38.0 |
| 3 <sup>a</sup> | 4.32                     | 39   | 1D           | 2.54                     | 23   |
| 4 <sup>a</sup> | 8                        | 53.5 | 2D           | 22                       | 52.1 |
| 1B             | 4.26                     | 37   | 3D           | 29                       | 15.2 |
| 2B             | 3.56                     | 32   | 4D           | 30                       | 18.0 |
| 3B             | 2.32                     | 21   | NEA          | 35                       | 8.4  |
| 4B             | 3.08                     | 28   | NEB          | 37                       | 13.0 |
| 1C             | 1.79                     | 16   | NEC          | 23                       | 59.0 |
| 2C             | 2.58                     | 23   | NED          | 16                       | 68.9 |

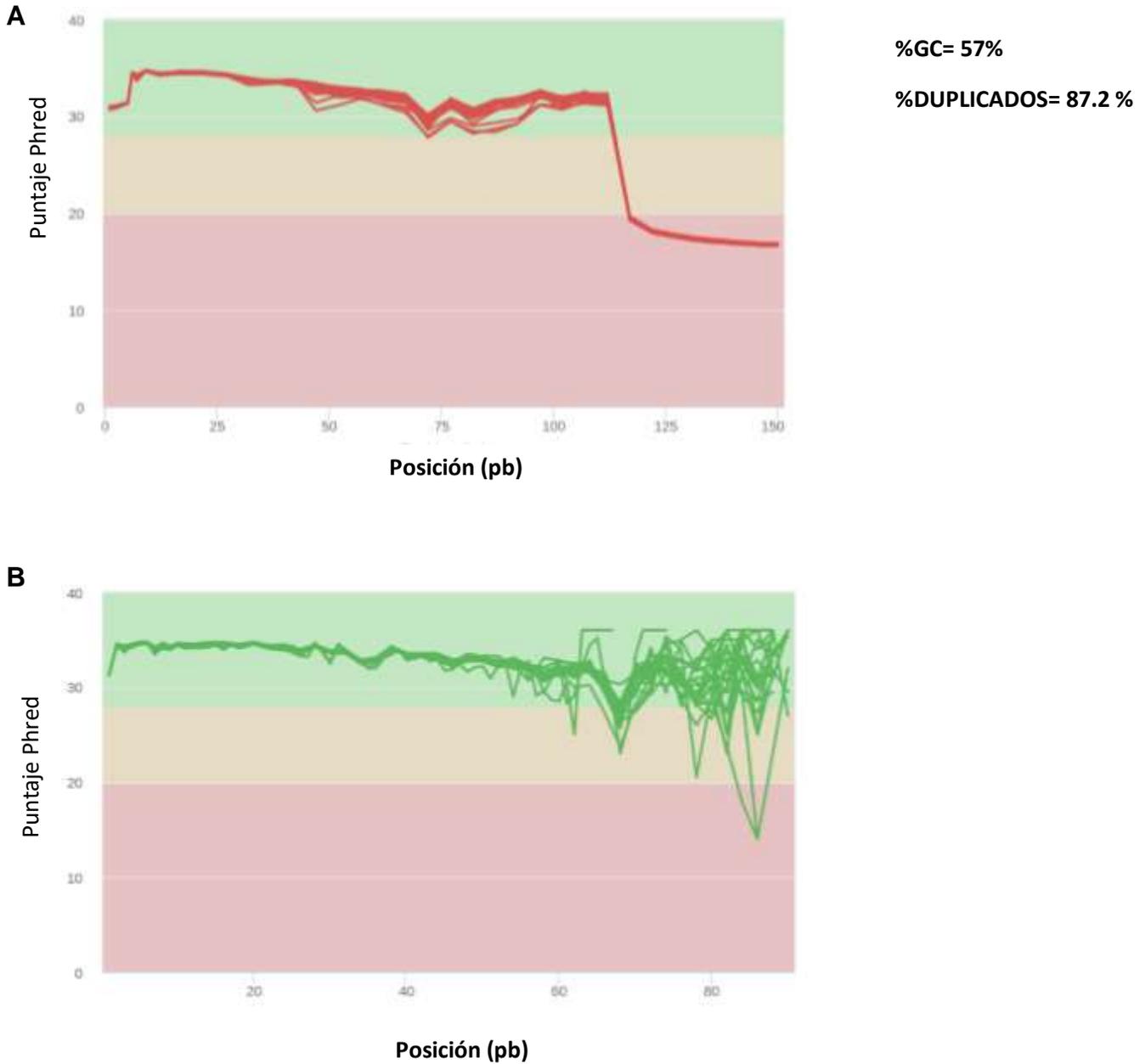
Los datos muestran las concentraciones del cDNA libre de adaptadores. Se reportan dos concentraciones por su uso en la metodología. Las letras indican a cada mujer embarazada (A-D). Los números están señalando el trimestre del embarazo y después del embarazo (1-4). NE: mujeres no embarazada.

#### 11.4 Control de calidad en las lecturas de las muestras de cDNA secuenciadas.

El control de calidad con FASTQC es una herramienta que se basa en evaluar la calidad de las lecturas obtenidas por secuenciación. La buena calidad de las lecturas nos indica que tan correctamente se realizó la secuenciación. La calidad es estudiada mediante los parámetros por el número de lecturas, el % GC, el porcentaje de secuencias duplicadas y el puntaje de calidad por base. El puntaje de calidad es más considerado y es calificado de acuerdo a cada base nitrogenada que fue asignada correctamente. El puntaje es llamado "puntaje de Phred" es el indicador de la calidad de secuenciación. El puntaje de Phred en valores de 20-30 indican que las lecturas obtenidas se encuentran dentro de los rangos óptimos para su análisis posterior, descartando posible señal de ruido basal o artefactos de la técnica. Las lecturas fueron leídas aproximadamente en la posición del nucleótido número 120 pb. El comportamiento de las lecturas se observa que aproximadamente en la posición 120 pb, la calidad mantiene un puntaje arriba de 30 pb. El descenso en las lecturas observada en la posición >100pb demuestran que durante la secuenciación el tamaño de lectura ya no corresponde a sncRNAs.

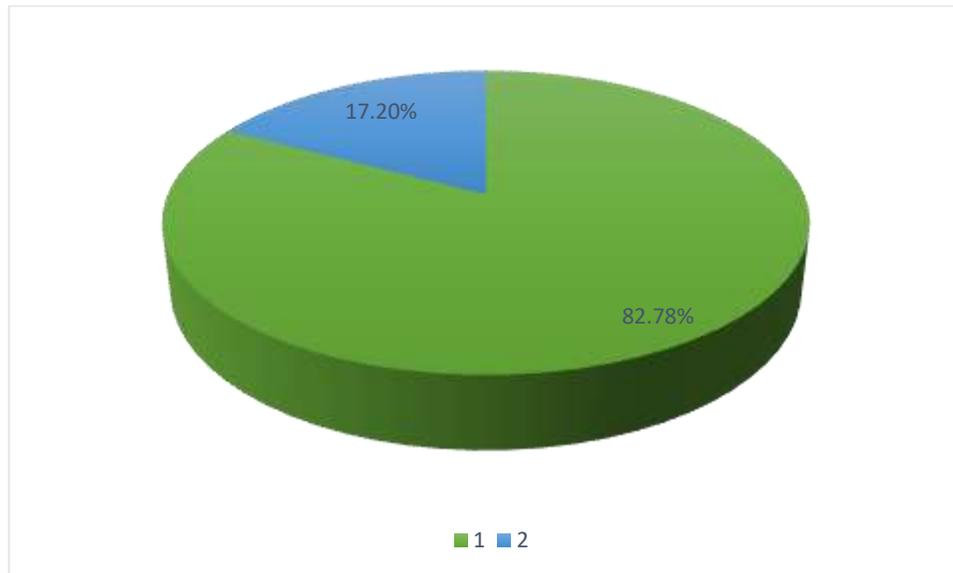
En la **figura 11** se puede observar que las lecturas muestran en diferentes picos por cada posición (pb) de los pares de bases infiriendo que se muestran dentro de los rangos aceptables por control de calidad. Eso quiere decir que la formación de secuencias se realizó de manera correcta.

### FastQC: Puntuaciones de calidad



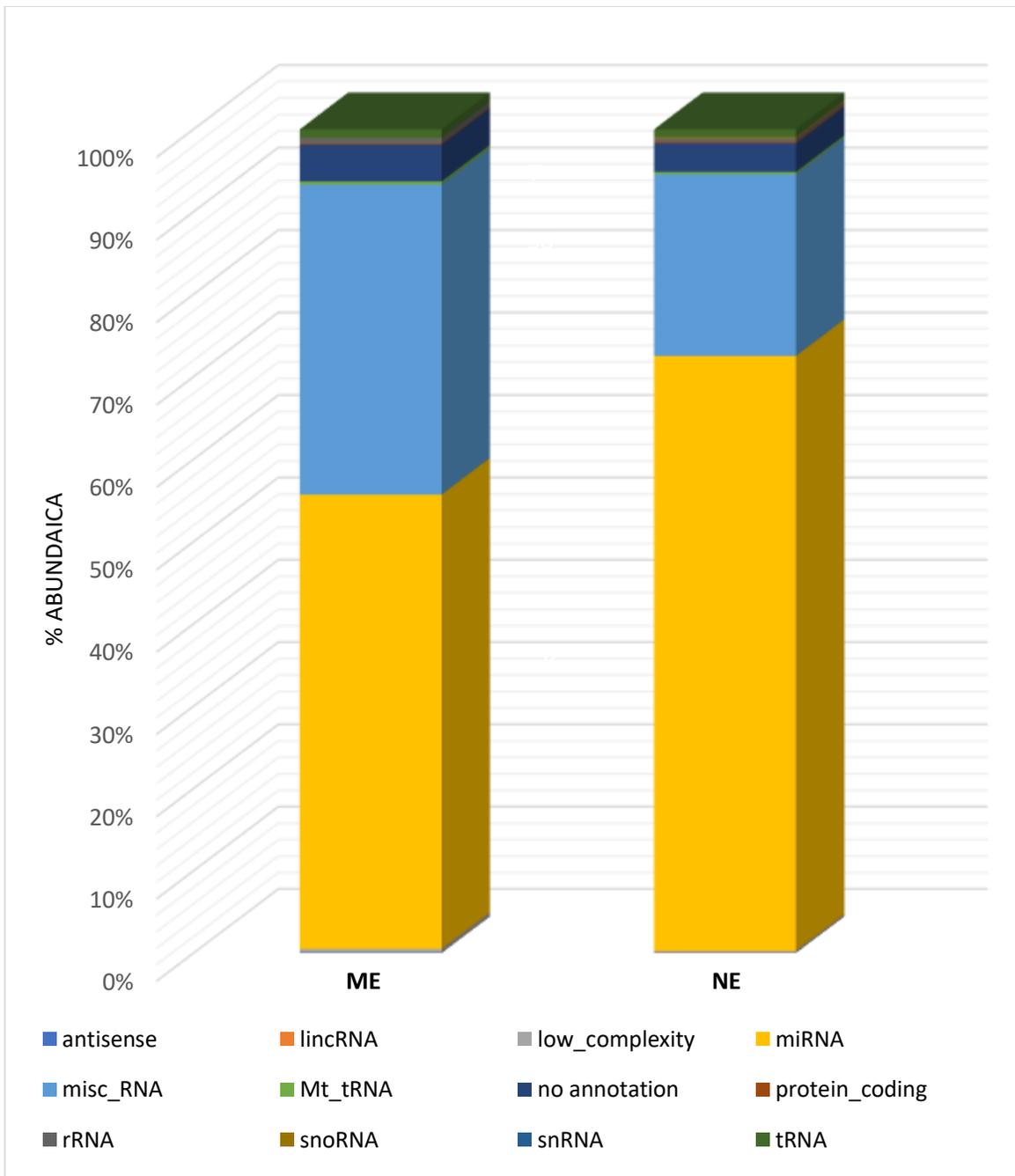
**Figura 11. Control de calidad en las lecturas antes y después de la eliminación de las secuencias de los adaptadores.** Las evaluaciones de la calidad de lecturas son calificadas como secuencias buenas cuando su valor es arriba del puntaje de Phred >30. A. Control de calidad de las secuencias medidas hasta la posición 120 pb. B. Calidad de secuencias hasta la posición 100 pb. Las franjas se dividen en los siguientes colores: verde se califica en el rango de excelente calidad, amarilla en aceptable y en rojo en mala calidad. El rango de calidad es aceptado a partir de >20 (puntaje de Phred).

Después del corte de los adaptadores, se pierde el 17.2% de lecturas. Las lecturas sin adaptadores serán las utilizadas para el análisis de abundancia de sncRNAs (**figura 12**).



**Figura 12.** Total de lecturas obtenidas antes y después del corte de adaptadores. Los datos indican las medias de lecturas con una DE 4868850. 1) Lecturas con adaptadores; 2) Lecturas sin adaptadores.

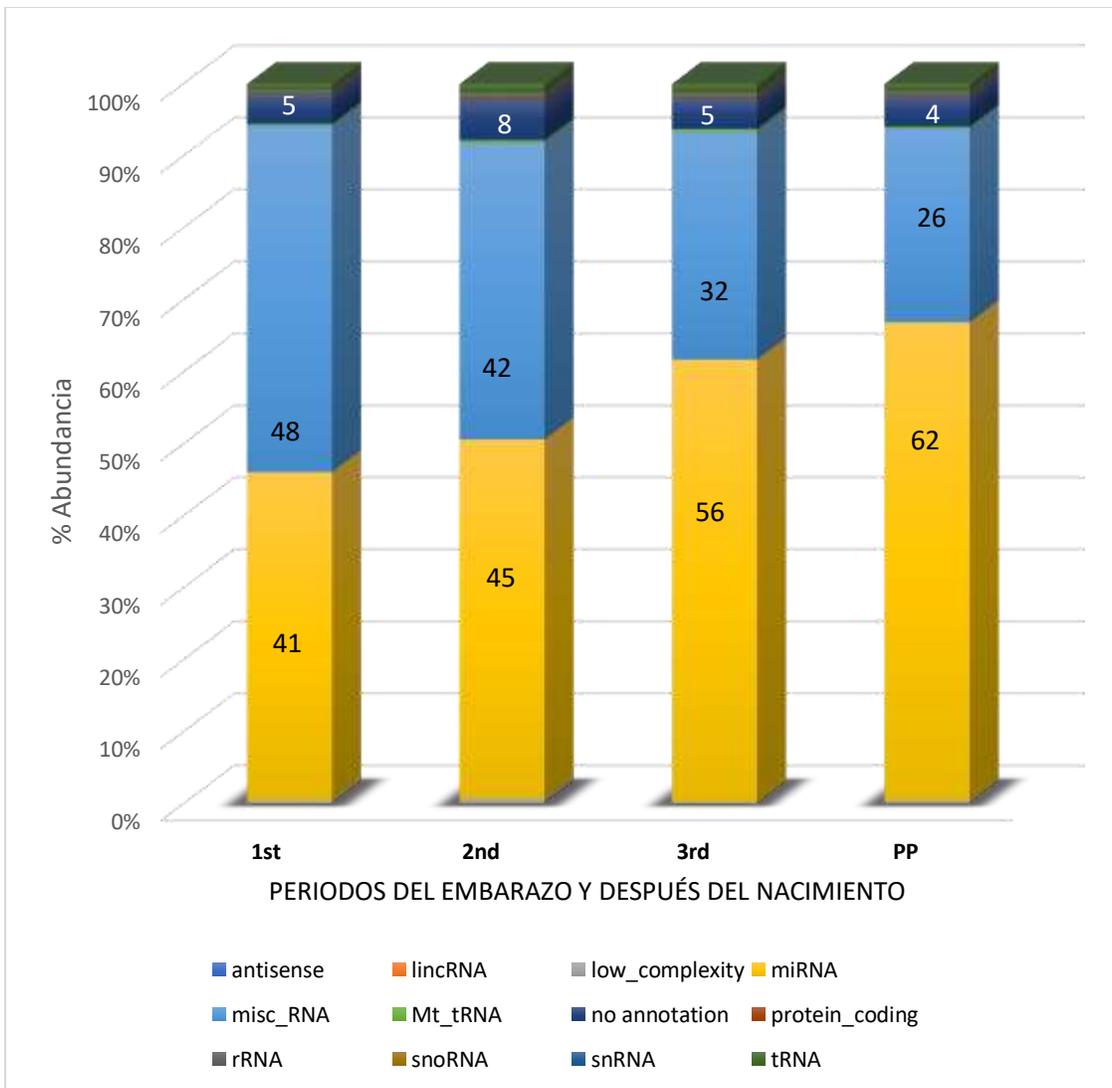
Las clases principales de sncRNAs identificadas en el plasma de ME y NE fueron los miRNAs, misc\_RNAs y no anotados. En menor medida, también se detectaron a los tRNAs, sncRNA, snRNA, low\_complexity, lincRNA (**Figura 13**).



**Figura 13.** Abundancia de sncRNAs circulantes en condición de embarazo y no embarazo. Las barras demuestran las abundancias relativas y se dividen en mujeres embarazadas (ME) y no embarazadas (NE). Las abundancias relativas se clasificaron en porcentajes de acuerdo con el número de lecturas que se obtuvieron por muestra agrupándose en la condición que le corresponde.

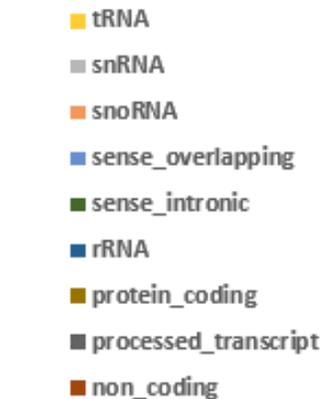
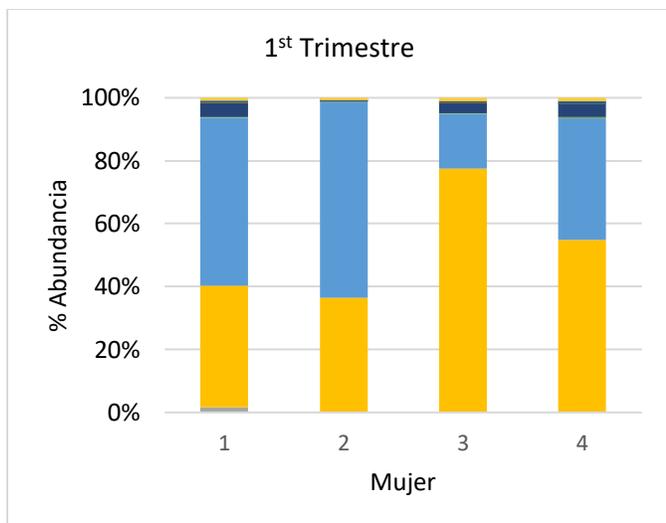
En la **Figura 14**, se demuestra que los porcentajes de expresión de las clases de sncRNAs circulantes en plasma fueron mayormente abundantes en los miRNAs, misc\_RNA y los no anotados. En el primer trimestre, los misc\_RNA se expresaron en un mayor porcentaje comparados a los miRNAs, seguido de los no anotados. En el segundo trimestre, el aumento en la abundancia de los miRNAs y los no anotados provocando una disminución de los misc\_RNA. En el tercer trimestre, se observó el progresivo aumento de los miRNAs y el decremento de los misc\_RNA y los no anotados. En el post parto, se observa un aumento de los miRNAs parecido a la abundancia de la condición control (NE), al igual, que los misc\_RNA y los no anotados. En menor abundancia se observan los mt\_RNA, low\_complexity, snRNA, snoRNA, tRNA y rRNA.

En la **Figura 15**, se observa la distribución de las abundancias de los sncRNAs circulantes en plasma por cada mujer embarazada en el 1°, 2°, 3° y después del embarazo. La dinámica que se presenta por cada mujer embarazada durante el progreso del embarazo se observa por la presencia de los miRNAs, misc\_RNAs y no anotados. La permanencia de estas clases de sncRNAs es constante a lo largo del embarazo, sin embargo, se observa un perfil diferente en la presencia de los sncRNAs por cada mujer embarazada.

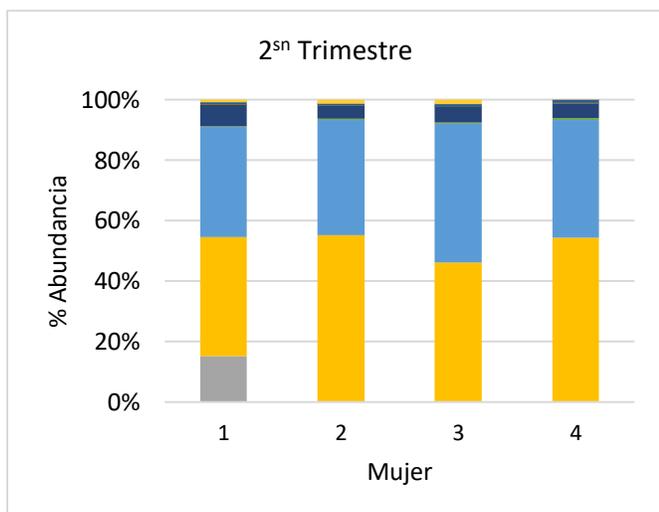


**Figura 14.** Abundancia relativa de los sncRNAs en el embarazo progresivo y después del efecto bifásico de miRNAs y misc\_RNAs. Los más abundantes fueron los miRNAs: amarillo; misc\_RNA: azul; no anotados: azul fuerte.

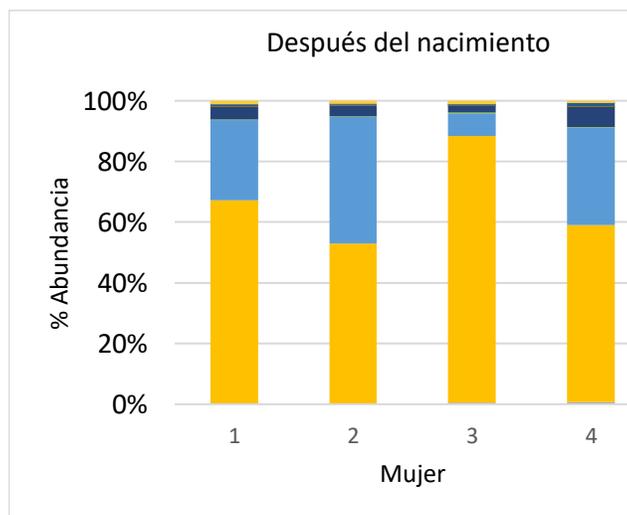
A



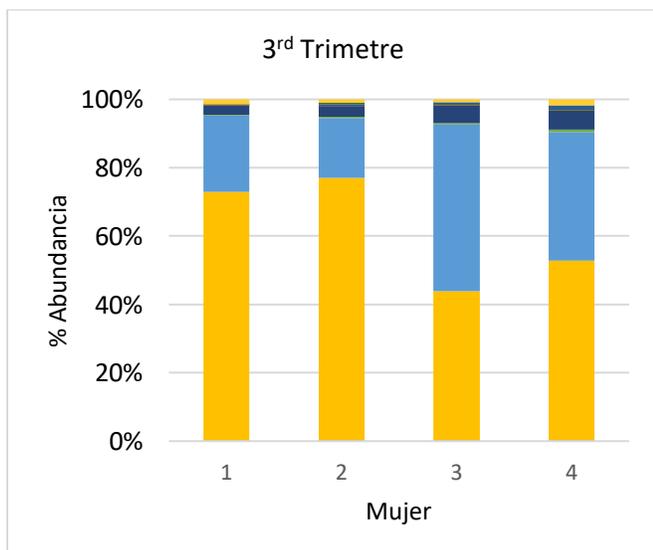
B



D



C



**Figura 15.** Perfiles de abundancia relativa de los sncRNAs por cada sujeto. Cada barra apilada muestra la abundancia relativa de los RNAs pequeños circulantes en porcentaje. miRNAs, misc\_RNA y no anotados fueron las clases de sncRNAs más abundantes encontrados en todas las muestras de plasma de mujeres embarazadas.

## 12. Discusión

Los estudios sobre los sncRNAs presentes en la sangre de mujeres embarazadas junto con los avances tecnológicos de secuenciación masiva experimentan un gran auge debido al interés por identificar biomarcadores de diagnóstico clínico asociados con los diversos desenlaces perinatales. Hasta el momento, no está clara la participación de las distintas clases de sncRNAs circulantes en diversas poblaciones de mujeres embarazadas con lo que se pueda identificar aquellos que provienen exclusivamente de la placenta, de la madre o del feto y con ello, determinar su función en este compartimento.

El RNA-seq es una técnica molecular que genera información sobre el tipo de transcritos primarios codificantes y no codificantes presentes en un tejido o célula, obteniendo así una cobertura profunda que permite la identificación de nuevos blancos moleculares implicados en diferentes condiciones fisiológicas. Los estudios que reportan la abundancia de sncRNAs en fluidos corporales en el ser humano utilizado con esta tecnología se encuentran en gran aumento debido a su especificidad, sensibilidad y el alcance de detección. Sin embargo, aún no se esclarece los tipos de sncRNAs que intervienen a lo largo del embarazo del mismo en condiciones saludables y que tengan alguna contribución funcional con los distintos estadios de la gestación.

El trabajo de esta tesis se enfocó en analizar los puntos críticos para el uso adecuado y óptimo de la técnica RNA-Seq bajo las condiciones de muestras sanguíneas de mujeres embarazadas colectadas en un hospital público del sector salud de la CDMX, ya que se debe de cumplir con los criterios estipulados por la NOM-007-SSA2-2016. El hallazgo y la aportación principal de la tesis es la identificación de una variación relativa en la abundancia de ciertas clases de sncRNAs durante la evolución del embarazo de mujeres clínicamente sanas que residen en urbes

marginadas económicamente. Una aportación menor, pero de relevancia tecnológica es la implementación de RNA-seq para la identificación de material genético circulante en muy bajas concentraciones debido a las limitaciones mismas de la cantidad y la calidad de ésta.

La técnica impone un desafío en cada paso de su metodología por lo que ejecutar controles de evaluación en la preparación de una biblioteca determina la calidad de secuencias. La concentración de RNA total que solicita la plataforma de Illumina es reportada entre un rango de 25-50 ng/uL para cubrir la preparación de una biblioteca y la secuenciación (Illumina, 2016). Sin embargo, siguiendo con nuestra metodología, no se logró obtener la concentración requerida. No obstante, la estrategia seguida fue el aislar RNA de la cantidad de plasma que obtenemos después de una toma y el amplificar el miR-U6 y miR-16 por la técnica RT-PCR permitiendo verificar que existía material genético en las muestras y con ello, continuar con la secuenciación. De no haber incurrido con esta estrategia, el uso de la técnica de RNA-seq hubiera tenido que ser anulada. El no cumplir con una concentración inicial de RNA total sugiere que en las secuencias haya la posibilidad de incluir sesgos, de una sobreamplificación de regiones ricas en GC y de generar secuencias duplicadas, provocando con esto confusiones en la interpretación de los resultados, por lo que es primordial la verificación en el tamaño de fragmentos con sus adaptadores antes de proseguir con la secuenciación (Van D *et al.*, 2014).

La plataforma de Illumina (© 2019 Illumina, Inc). es evaluado normalmente por un sistema de calidad que valida la correcta preparación de una biblioteca. Sin embargo, debido a las condiciones presentadas en nuestra metodología, se tuvo que realizar una validación con un sistema adicional "TapeStation" para comprobar la presencia de cDNA después de la purificación, además de que no se sabía si se lograría la formación de la biblioteca puesto que se desconocía la concentración de RNA total. El tamaño de la biblioteca está determinado por

el tamaño del inserto o templado. Para el estudio los scnRNAs, el tamaño óptimo del inserto debe ser <200pb, puesto que, introduce menos sesgos (Podnar, Deiderick, Huerta, & Hunicke-Smith, 2014). En nuestro estudio el tamaño del inserto se encontró en un rango entre 22-23 pb y del adaptador entre 127-129 pb. El progreso de la formación de la biblioteca en otros estudios únicamente los reporta con la validación del Bioanalizador puesto que sus rangos de concentración se reportan entre 10-100 ng/μL. El sistema “TapeStation” tiene una mayor sensibilidad para detectar niveles bajos de concentración de RNA total evaluando el rendimiento, la distribución de tamaño y la concentración. Es necesario mencionar que el sistema “TapeStation” es menos aplicable debido a los altos costos (Nietsch *et al.*, 2016; Podnar *et al.*, 2014).

La calidad de las lecturas destaca la calidad de la secuenciación y la preparación de la biblioteca ambas nos aseguran que todas las lecturas en el conjunto de datos fueron mapeadas y alineadas correctamente con el genoma humano. El número de lecturas requeridas para relacionar el número de lecturas y la abundancia relativa se requiere de 1 a 5 millones de lecturas por muestra debido a la corta longitud de los sncRNAs (© 2019 Illumina, Inc). La disminución de las lecturas después del corte de adaptadores señala que la eliminación de aquellas lecturas demasiados cortas que no fueron mapeadas en el genoma. Nuestros resultados se destacaron por obtener un alto número de lecturas (**véase fig. 12**). Lo que refleja que el aislamiento del RNA y la preparación de la biblioteca se efectuaron correctamente. Cada uno de los puntos críticos de la técnica fueron certificados y analizados con éxito a pesar de la condición de concentración desconocida.

En este trabajo se analizaron los sncRNAs circulantes de mujeres embarazadas y no embarazadas a través del RNA-seq. Debido a que existen reportes que mencionan la

variabilidad en los sncRNA por edad, sexo, raza, condiciones ambientales, dieta y enfermedades (EtcheGARAY & Mostolavsky, 2016; Lee *et al.*, 2017; Miura *et al.*, 2017), se diseñó una estrategia para tomar muestras de una población lo más homogénea posible en ambos grupos de mujeres. Es importante mencionar que las mujeres embarazadas provienen de una región con bajos recursos en la CDMX, mientras que las no embarazadas presentan mejores condiciones sociodemográficas. No obstante, ambos grupos presentaron rasgos homogéneos en la edad, sexo, raza y estado de salud difiriendo únicamente en su estado socioeconómico.

El Hospital General Dr. Enrique Cabrera de la SEDESA se localiza en el lado norponiente de la CDMX. El sector de mujeres embarazadas que se atiende en este hospital vive en colonias cercanas o pertenecientes a las delegaciones Magdalena Contreras, Cuajimalpa y Miguel Hidalgo. A pesar de competir con la marginación, violencia y estado socioeconómico bajo, las mujeres embarazadas de este estudio mostraron un estado saludable validado bajo los parámetros clínicos y bioquímicos. Si comparamos nuestros grupos de mujeres con la de otros estudios realizados en poblaciones de Japón, China y E.U.A. (Pan *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011), podemos aseverar que la información clínica y sociodemográfica de estas otras poblaciones no es lo suficientemente explícita para esclarecer si el factor sociodemográfico en distintas razas poblacionales está jugando un papel preponderante en la abundancia de los sncRNAs (Maccani 2010; Maccani 2012). Otras características clínicas como la ganancia de peso y las presiones diastólica y sistólica no han sido contempladas para los mismos propósitos de abundancia tanto en nuestro estudio como en el de las otras poblaciones, por lo que se recomiendan utilizar estos parámetros en futuros análisis sobre todo en desenlaces perinatales de preeclampsia (Yang *et al.*, 2011).

El embarazo se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos y anatómicos en los que contribuye la placenta. Para sobrellevar las demandas requeridas del crecimiento fetal y del propio embarazo, tanto la placenta como los rasgos metabólicos, genéticos, ambientales y posiblemente socioeconómicos pueden ser factores que intervengan en la modificación de la expresión de los sncRNAs circulantes (Cai *et al.*, 2017). La importancia de dilucidar la abundancia de los sncRNAs en la circulación materna es definir su participación en el embarazo conectando cascadas de redes reguladoras materno-fetal participantes en la placentación, desarrollo embrionario y neuronal, diferenciación de las células del trofoblasto, respuestas inmunitarias, endocrino, además de implicarse en la comunicación de célula-célula (Cheng *et al.*, 2013; Wessels *et al.*, 2013). De tal manera, que esas conexiones permitan entender su función específica en el embarazo.

Los miRNAs tiene funciones reguladoras en procesos biológicos como la angiogénesis, apoptosis, ciclo celular, proliferación y diferenciación celular (Kim N., 2005). En el embarazo existen miRNAs reportados que tienen función placentaria y participan en la proliferación y diferenciación del trofoblasto, migración e invasión y crecimiento placentario (Morales-Prieto, 2013) (Miura *et al.*, 2017) (Ehman *et al.*, 2017). Los cambios en las partes fisiológicas, hormonales, metabólicas que también desempeña los órganos principales para el mantenimiento de la gestación como son hígado, riñón, estómago, cerebro, etc., pueden ocasionar cambios dinámicos en los patrones en la abundancia (Purizaca, 2010). Nuestros datos muestran que la participación de los miRNAs cobra relevancia con respecto al progreso del embarazo, ya que su abundancia incrementa conforme la evolución de la gestación.

Un ejemplo de esto fue lo observado con respecto a la abundancia con la que comienzan los misc\_RNA en el embarazo y que ésta se va reduciendo conforme al término del mismo. Sin

embargo, no existe información alguna sobre su función o participación como moléculas circulantes en el embarazo (Majewska *et al.*, 2018). Hasta el momento, los misc\_RNA se describen como una composición de diversos productos de la transcripción de otras clases de RNAs (Sreekumar *et al.*, 2011). En las células se sabe que los misc\_RNA están implicados en la regulación en el gen (MSRA). Este gen pertenece a una familia de enzimas que modula la respuesta al estrés oxidativo, metabolismo de la metionina y modificación de procesos celulares de proteínas (Begara-Morales *et al.*, 2014).

La tercera clase de sncRNAs que presentó mayor abundancia en el plasma de las mujeres embarazadas fueron los “no annotation RNA”. Estos se clasifican entre los RNAs desconocidos por la falta de información tanto en su estructura como en su función. Se propone indagar más a cerca de estos sncRNAs que podrían contribuir con el esclarecimiento de procesos reguladores génicos. Esto a través de la biogénesis de moléculas que pudieran ser productos intermedios de RNAs o productos de la edición específica de sncRNAs (Ludwig & Giebel, 2012).

En menor abundancia se presentaron otras clases de sncRNAs a lo largo del embarazo. En el caso de los mt\_tRNA y tRNA basándose en la abundancia de otros datos biológicos explican que los tRNA y los mt\_RNA tienen una implicación en la genética mitocondrial humana. Existen estudios que dan evidencia de un vínculo a partir del surgimiento de mutaciones en el gen mt\_tRNA afectando mediante modificaciones transcripcionales la biogénesis y función de los tRNA. Es decir, que conjuntamente los genes de tRNA generan un efecto en el fenotipo de la célula. Por lo tanto, ambos son principalmente el foco para provocar mutaciones en las células (Diroma, Lubisco, & Attimonelli, 2016). Ahora bien, respecto al papel en que se involucra los snRNA y los snoRNA. Los snoRNA participan en la regulación del procesamiento del rRNA y el mRNA provocando modificaciones pos-transcripcionales. Después del parto se presentó una

relación respecto a la condición control en el que se observó un parecido en la abundancia relativa de los sncRNAs. De igual manera, se presentaron resultados de la distribución de las abundancias por cada mujer embarazada a lo largo del embarazo. La dinámica en cada clase de sncRNAs por mujer embarazada se visualiza muy distintas entre ellas mismas, de tal manera que esto demuestra que la composición de los sncRNAs presentes en plasma se ven alterados por dos condiciones: el embarazo, el trimestre del embarazo y el mismo individuo. Dado estos resultados puede relacionarse con nuestra hipótesis, es decir, que se llevó a cabo la detección de sncRNAs circulantes en plasma en condiciones diferentes de metodología que han sido descritas por otros grupos de investigación.

La comprensión de la función de los sncRNAs por separado y en conjunto permitirá esclarecer los procesos reguladores génicos en los que participan a nivel celular como en la circulación. La placenta tiene una contribución importante en la secreción de las diversas clases de sncRNAs (Tamaru *et al*, 2019; Zhu *et al*, 2009; Li *et al*, 2013). Entre ellos se han descrito a aquellos que tienen una función placentaria mir-519, mir-520, mir-498, mir-517, mir-518 (Liang *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2010; Morales-Prieto *et al.*, 2012). La placenta participa como un comunicador entre la madre y el feto, y sus funciones de transferencia de la información genética, hormonal y factores externos (ambiental, nutricional) (Tong & Chamley, 2015). La secreción de los exosomas hacia la circulación sanguínea contribuye en el transporte de los sncRNAs.

La presencia de los sncRNAs circulantes es relacionada a varias vías de regulación por lo que es necesario ampliar los estudios para proponer nuevas vías regulatorias de la condición gestacional y añadir posibles mecanismos implicados en el desarrollo del feto y la función placentaria. Sin embargo, el sector salud de la Ciudad de México todavía tiene una escasa información acerca de los estudios genómicos que pueden ser realizados en las mujeres

embarazadas por medio de las consultas perinatales. Para estudios futuros se recomienda desplegar la información con el personal hospitalario, pacientes y familiares. De tal manera que se busque integrar los conocimientos para la mejora de la salud gestacional de las pacientes.

Ahora bien, para profundizar el estudio de los sncRNAs circulantes en plasma es necesario mencionar que para predecir la participación de estas moléculas en el embarazo se tiene que aumentar el número de participantes embarazadas y dirigir la propuesta de alguna clase de sncRNAs como biomarcadores de diagnóstico y sea utilizado en hospitales perinatales, de igual manera, integrar la información de la genética paterna para que sea considerado durante el análisis.

### **13. Conclusiones**

El utilizar muestras biológicas como medios de diagnóstico en el área clínica implica proceder a metodologías realmente estrictas durante su recolección y procesamiento para que puedan ser usadas en laboratorios de diagnóstico genómico. La evidencia mostrada en este trabajo nos permite establecer que, además de los miRNAs estudiados con anterioridad, existe una abundancia relativa de otros sncRNAs que podrían participar en el desarrollo del embarazo. Las clases con mayor relevancia durante el embarazo fueron los miRNAs, misc\_RNAs y los no anotados. La variabilidad en las abundancias relativas en condición de embarazo y por trimestre de embarazo las propone a emplear como un biomarcador de diagnóstico no invasivo de embarazo y de seguimiento durante el desarrollo. No obstante, aún falta ampliar los sujetos de estudios de origen mexicano para presentar una lista mejor caracterizada de los sncRNAs circulantes. Los no anotados es la clase propuesta en investigar con mayor detalle.

RNA-seq es una técnica que puede ser utilizada para el diagnóstico clínico la cual aporta información sobre los procesos biológicos implicados en el desarrollo del embarazo. Se puede realizar un análisis en transcriptómica con concentraciones de RNA aceptables para el detector del secuenciador partiendo de muestras clínicas.

#### 14. Referencias

1. Abbassi-Ghanavati, M., Greer, L. G., & Cunningham, F. G. (2009). Pregnancy and laboratory studies: A reference table for clinicians. *Obstetrics and Gynecology*, 114(6), 1326–1331.  
DOI: 10.1097/AOG.0b013e3181c2bde8
2. Adam S., Elfeky O., Kinhal V., Dutta S., Lai A., Jayabalan N., Salomon C. (2017). Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles. Implications for complications of pregnancies. *Placenta*, 54, 83–88. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.12.001
3. Allen L. (2013). Nutrient Regulation during Pregnancy, Lactation, and Infant Growth. Springer Science & Business Media. 352. 99-108.
4. Amb. (s.f.). Next Generation Sequencing Service. Recuperado de: <https://www.abmgood.com/Next-Generation-Sequencing-Service.html>. Fecha de consulta: 15 de noviembre 2019
5. Anderson, P. Ivanov, P. (2015). tRNA fragments in human health and disease. *FEBS Lett* 28; 588(23): 4297–4304. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.09.001.Trna
6. Ansorge W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 25(4), 195–203. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009
7. Arroyo JD., Chevillet JR., Kroh EM., Ruf IK., Pritchard CC., Gibson DF., Tewari M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 5003–5008.  
DOI: 10.1073/pnas.1019055108
8. Ashton Q. (2012). Preeclampsia: New insights for the healthcare professional. Scholarly editions. Atlanta, Georgia.
9. Babraham institute. Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html>
10. Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc. 1 ed. 530  
DOI: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6
11. Banco Nacional de ADN, S. (2010). ADN de pureza óptima ADN pureza aceptable presencia de compuestos aromáticos contaminación con ARN, 2–7. Retrieved from [bancoadn.org](http://bancoadn.org)

12. Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Luque, F., Leyva-Pérez, M. O., Leterrier, M., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2014). Differential transcriptomic analysis by RNA-seq of GSNO-responsive genes between arabidopsis roots and leaves. *Plant and Cell Physiology*, 55(6), 1080–1095.  
DOI: 10.1093/pcp/pcu044
13. Bhome, R., Del Vecchio, F., Lee, G. H., Bullock, M. D., Primrose, J. N., Sayan, A. E., & Mirnezami, A. H. (2018). Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Letters*, 420, 228–235. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.02.002
14. Cai M., Kolluru G. K., Ahmed A. (2017). Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. *Journal of Pregnancy*, 1–15. DOI: 10.1155/2017/6972732
15. Carthew, RW. Sontheimer, EJ. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136:642–655. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.035
16. Chamberlain, G., Hytten, F.E. Chamberlain, G. (1980). Fisiología clínica en obstetrician. *Blackwell Scientific*, Oxford; Boston; Melbourne
17. Cheng, H. H., Yi, H. S., Kim, Y., Kroh, E. M., Chien, J. W., Eaton, K. D., Pritchard, C. C. (2013). Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS ONE*, 8(6), 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0064795
18. Cheng, L., Meyers, Blake C. y Green, PJ. (2007). Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods*. 43(2); 110-117. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.05.002
19. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen K., Zhang CY. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Tendencias de la célula Biol*. 22, 125–132.
20. Chiarello, D.I. Salsoso, R. Toledo, F. Mate, A. Vazquez, CM. Sobrevia, L. (2017). Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*. 60: 69-80. DOI: 10.1016/j.mam.2017.12.002 LK
21. Chim, S. S. C., Shing, T. K. F., Hung, E. C. W., Leung, T. Y., Lau, T. K., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 54(3), 482–490. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071715-050711.Sources
22. Chiu, W.K. R. Lui W. (2006). Time Profile of Appearance and Disappearance of Circulating Placenta-Derived mRNA in Maternal Plasma. *Clinical chemistry*, 52, 2, 313-314. DOI:10.1373/clinchem.2005.059691
23. Chu, C., Rana T. M. (2007). Small RNAs: Regulators and Guardians. *Journal of cellular physiology*. 207(1); 12-22. DOI: 10.1002/JCP
24. Chu, Y., & Corey, D. R. (2012). RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic acid therapeutics*, 22(4), 271–274. DOI: 10.1089/nat.2012.0367.
25. Cretoi, D. Jiahong, X. Junjie, X. Nicolae, S. Sanda, MC. (2016). Circulating MicroRNAs as Potencial Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Disease Markers* 2016, 1-7.  
DOI: 10.1155/2016/3851054

26. Colombo, M. Raposo, G. Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 255–289. [DOI:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326)
27. Diroma, M. A., Lubisco, P., & Attimonelli, M. (2016). A comprehensive collection of annotations to interpret sequence variation in human mitochondrial transfer RNAs. *BMC Bioinformatics*, 17(Suppl 12). [DOI:10.1186/s12859-016-1193-4](https://doi.org/10.1186/s12859-016-1193-4)
28. Donker R. B., Mouillet J. F., Chu T., Hubel C. A., Stolz D. B., Morelli A. E., Sadovsky Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes, 18(8), 417–424. [DOI: 10.1093/molehr/gas013](https://doi.org/10.1093/molehr/gas013)
29. Dumont, T. Mouillet, J. F. Bayer, A. Gardner, C. L. Klimstra, W. B., Wolf, D. G. Sadovsky, Y. (2017). The expression level of C19MC miRNAs in early pregnancy and in response to viral infection. *Placenta*, 53, 23–29. [DOI: 10.1016/j.placenta.2017.03.011](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.011)
30. Ehman E.C., Johnson G.B., Villanueva-meyer J. E., Cha S., Leynes A. P., Eric P. Hope T. A. (2017). The function of miR-519d in cell migration, invasion, and proliferation suggests a role in early placentation. *Placenta* 48: 34–37. [DOI: 10.1002/jmri.25711](https://doi.org/10.1002/jmri.25711).PET/MRI
31. Engel, C. Gubbey, T. Neyer, S. Sainsbury, S. Oberthuer, C. Baejen, C. Bernecky, C. Cramer, P. (2017). Structural Basis of RNA Polymerase I Transcription Initiation. *Cell* 169, 120–131. [DOI: 10.1016/j.cell.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.003)
32. Etchegaray, J. P., & Mostoslavsky, R. (2016). Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Molecular Cell*, 62(5), 695–711. [DOI: 10.1016/j.molcel.2016.05.029](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.029)
33. Freedman, J. E., Gerstein, M., Mick, E., Rozowsky, J., Levy, D., Kitchen, R., Tanriverdi, K. (2016). Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nature Communications*,
34. Frydrychowicz M., Kolecka-Bednarczyk A., Madejczyk M., Yasar S., Dworacki, G. (2015). Exosomes structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 81(1), 2–10. [DOI:10.1111/sji.12247](https://doi.org/10.1111/sji.12247)
35. Fu, G., Brki, J. Hayder, H. Peng, C. (2013). MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications, 5519–5544. [DOI: 10.3390/ijms14035519](https://doi.org/10.3390/ijms14035519)
36. Fuchs RT, Sun Z, Zhuang F, Robb GB (2015) Bias in Ligation-Based Small RNA Sequencing Library Construction Is Determined by Adaptor and RNA Structure. *PLoS ONE* 10(5): e0126049. [DOI: 10.1371/journal.pone.0126049](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126049)
37. Ge, Q., Li, H., Yang, Q., Lu, J., Tu, J., Bai, Y., & Lu, Z. (2011). Sequencing circulating miRNA in maternal plasma with modified library preparation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412(21-22), 1989–1994. [DOI: 10.1016/j.cca.2011.07.010](https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.010)
38. Ghildiyal, M. Zamore, P. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 10(2): 94–108. [DOI:10.1038/nrg2504](https://doi.org/10.1038/nrg2504).
39. Govindarajan R, Duraiyan J, Kaliyappan K, Palanisamy M. Microarray y sus aplicaciones. *J Pharm Bioall*

- Sci [serial en línea] 2012 [consultado el 5 de agosto de 2019]; 4, Supl S2: 310-2. Disponible en: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2012/4/6/310/100283>
40. Green, D., Fraser, WD y Dalmay, T. (2016). Transferencia de ARN pequeños derivados de ARN en el transcriptoma del cáncer. *Revista europea de fisiología*, 468 (6), 1041-1047.  
[DOI: 10.1007 / s00424-016-1822-9](https://doi.org/10.1007/s00424-016-1822-9)
  41. Griffiths-Jones S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research*. 32: 109D 111.  
[DOI: 10.1093/nar/gkh023](https://doi.org/10.1093/nar/gkh023)
  42. Grobhans, H. Filipowicz, W. (2008). The expanding world of small RNAs. *Nature* 451, 414- 416.  
[DOI: 10.1038/451414a](https://doi.org/10.1038/451414a)
  43. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, Kisakesen HI, Benian A, Aydinli K. (2017). Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology. *Placenta* 52. 77-85. [DOI: 10.1016/j.placenta.2017.02.019](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.019) 0143-4004
  44. Guo, Y., Vickers, K., Xiong, Y., Zhao, S., Sheng, Q., Zhang, P., Flynn, C.R. (2017). Comprehensive evaluation of extracellular small RNA isolation methods from serum in high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 18(1), 1–9. [DOI: 10.1186/s12864-016-3470-z](https://doi.org/10.1186/s12864-016-3470-z)
  45. Hand, MJ. Bazzini, AA. (2017). When LIN41 comes to a fork in the road, it takes both paths: Translational repression or mRNA decay depending on the target site position. *Molecular Cell* 65, 375-377.  
[DOI: 10.1016/j.molcel.2017.01.018](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.018)
  46. Häntzsch, M., Tolios, A., Beutner, F., Nagel, D., Thiery, J., Teupser, D., & Holdt, L. M. (2014). Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and miRNA profiles. *PLoS ONE*, 9(12), 1–17. [DOI: 10.1371/journal.pone.0113298](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113298)
  47. Hawkins, S. F., & Guest, P. C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1546, 125–133. [DOI:10.1007/978-1-4939-6730-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8)
  48. Higashijima A., Miura K., Mishima H., Kinoshita A., Jo O., Abe S., Masuzaki H. (2013). Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenatal Diagnosis*, 33(3), 214–222.  
[DOI: 10.1002/pd.4045](https://doi.org/10.1002/pd.4045)
  49. Ibarra A., Vega-Guedes, B. Brito-Casillas Y. y Wägner, A. (2018). Diabetes in Pregnancy and MicroRNAs: Promises and Limitations in Their Clinical Application. *Non-Coding RNA*, 4(4), 32.  
[DOI: 10.3390/ncrna4040032](https://doi.org/10.3390/ncrna4040032)
  50. Iwasaki, YW. Siomi, MC. Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*. 84:405–33. [DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034258](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258)
  51. Jairajpuri, D. S. Malalla, Z. H., Mahmood, N. y Almawi, W. Y. (2017). Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity. *Gene*, 627(June), 543–548. [DOI: 10.1016/j.gene.2017.07.01](https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.01)
  52. Jeppensen, DK. Fenix, AM. Franklin, JL. Rome, LH. Burnette, DT. Coffey RJ. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 177, 428-445. [DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029)
  53. Kawaji H., Nakamura M., Takahashi Y., Sandelin A., Katayama S., Fukuda S., Hayashizaki Y. (2008). Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics*, 9, 1–21. [DOI: 10.1186/1471-2164-9-157](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-157)

54. Kim V. N., Han J., Siomi M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126–139. DOI:10.1038/nrm2632
55. Kim, NV. (2005). Small RNAs: Classification, biogenesis and function. *Molecules and Cell* 19,1-15. DOI: 10.1016/j.chaos.2006.08.007
56. Kiss, T. (2002). Small Nucleolar RNAs: An abundant group of noncoding RNA with diverse cellular functions. *Cell*.109; 145-14. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00718-3
57. Kobayashi H. y Tomari, Y. (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 71–81. DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.08.007
58. Kotlabova, K. Doucha, J. Hromadnikova I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol*. 89:185–191. DOI: 10.1016/j.jri.2011.02.006
59. Kuang, J., Yan, X., Genders, AJ., Granata, C., Bishop, D J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE*. 13; 1-27. DOI: 10.1371/journal.pone.0196438
60. Kukurba, K. R. y Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(11), 951–969. DOI: 10.1101/pdb.top084970
61. Langseth, H., Bucher-johannessen, C., Fromm, B., & Keller, A. (2018). Comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biology*, 15(2), 242–250. DOI: 10.1080/15476286.2017.1403003.
62. Lee, I., Baxter, D., Lee, M. Y. Scherler K., Wang K. (2017). The Importance of Standardization on Analyzing Circulating RNA. *Molecular Diagnosis and Therapy*. 21(3); 259-268. DOI: 10.1007/s40291-016-0251-y
63. Li, H., Guo, L., Wu, Q., Lu, J., Ge, Q., & Lu, Z. (2012). A comprehensive survey of maternal plasma miRNAs expression profiles using high-throughput sequencing. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(5-6), 568–576. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.026
64. Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589–595. DOI:10.1093/bioinformatics/btp698
65. Li H., Ge Q., Guo L. y Lu, Z. (2013). Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies. *BioMed Research International*, 2013, 1–9. DOI:10.1155/2013/970265
66. Li, L. Roden, J. Shapiro, B E. Barbara J W. Bhatia, Forman, S J. Bhatia, R. (2005). Reproducibility, fidelity, and discriminant validity of mRNA amplification for microarray analysis from primary hematopoietic cells. *Journal of Molecular Diagnostics*. 7(1); 48-56. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60008-6
67. Lo D., Sargent I. L., Redman C. W., Lo Y. M. D., Corbetta N., Chamberlain, P. F., Redman C. W. G. (1997). Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum Early report Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*. 485–487. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0
68. Ludwig, A. K., & Giebel, B. (2012). Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), 11–15. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.10.005
69. Luo SS., Ishibashi O., Ishikawa G., Ishikawa T., Katayama A., Mishima T., Takizawa, T. (2009). Human

- Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 81(4), 717–729. DOI: [10.1095/biolreprod.108.075481](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075481)
70. Majewska, M., Lipka, A., Paukzsto, L., Jastrzebski, J. P., Gowkielewicz, M., Jozwik, M. (2018). Preliminary RNA-seq analysis of long non-coding RNAs expressed in human term placenta. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 1-22. DOI: [10.3390/ijms19071894](https://doi.org/10.3390/ijms19071894)
  71. Martin S. A., Dehler CE, Król E. (2016). Transcriptomic responses in the fish intestine. *Developmental and Comparative Immunology*. 64, 103-117. DOI: [10.1016/j.dci.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.014)
  72. Mattick, J. S., Makunin I. V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14(SPEC. ISS. 1), 121–132. DOI: [10.1093/hmg/ddi101](https://doi.org/10.1093/hmg/ddi101)
  73. Mayor-Lynn, K. Toloubeydokhti, T. Cruz, A. C. y Chegini, N. (2011). Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reproductive Sciences*, 18(1), 46–56. DOI: [10.1177/19337191110374115](https://doi.org/10.1177/19337191110374115)
  74. McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V., Grebe, S. K., & Algeciras-Schimnich, A. (2011). Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clinical Chemistry*, 57(6), 833–840.
  75. Menon, R., Debnath, C., Lai, A., Guanzon, D., Bhatnagar, S., Kshetrapal, P. K., Salomon, C. (2019). Circulating exosomal miRNA profile during term and preterm birth pregnancies: A longitudinal study. *Endocrinology*, 160(2), 249–275. DOI: [10.1210/en.2018-00836](https://doi.org/10.1210/en.2018-00836)
  76. Metzker, ML. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature reviews. Genetics*. 11(1); 31-46. DOI: [10.1038/nrg2626](https://doi.org/10.1038/nrg2626).
  77. Michell D. L. y Vickers, K. C. (2016). Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*. 12, 2069–2074. DOI: [10.1016/j.bbalip.2016.01.011](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.011)
  78. Mincheva NL., Baranov V. (2010). The Role of Placental Exosomes in Reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 520–533. DOI: [10.1111/j.1600-0897.2010.00822.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00822.x)
  79. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 10513–10518. DOI: [10.1073/pnas.0804549105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105)
  80. Miura, K., Higashijima, A., Murakami, Y., Fuchi, N., Tsukamoto, O., Abe, S., Masuzaki, H. (2017). Circulating Levels of Pregnancy-Associated, Placenta-Specific microRNAs in Pregnant Women With Placental Abruption. *Reproductive Sciences*, 24(1), 148–155. DOI: [10.1177/1933719116653837](https://doi.org/10.1177/1933719116653837)
  81. Mouillet, JF. Ouyang, Y. Coyne, C. Sadovsky, Y. (2016). MicroRNAs in placental health and disease. *J Obstet Gynecol*. 213(4 0);S163–S172. DOI: [10.1016/j.ajog.2015.05.057](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057)
  82. Mouillet JF., Mishima T, Paffaro A M., Parks T W., Ziegler JA., Chu T., Sadovsky Y. (2015). The expression and post-transcriptional regulation of FSTL1 transcripts in placental trophoblasts. *Placenta*. 36(11): 1231–1238. DOI: [10.1016/j.placenta.2015.09.005](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.09.005).
  83. Morales Prieto DM, Markert UR. (2011). MicroRNAs in pregnancy. *Reprod Immunol*. 88: 106-111. DOI: [10.1016/j.jri.2011.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.01.004)
  84. Morales-Prieto, D. M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., & Markert, U. R. (2013).

Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), 51–61.

[DOI: 10.1016/j.jri.2012.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.11.001).

85. Moreno, V. (n.d.). Uso de chips de ADN (microarrays) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados.
86. Murakami Y., Miura K., Sato S., Higashijima A., Hasegawa Y., Miura S., Masuzaki, H. (2018). Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(5), 840–851. [DOI:10.1111/jog.13610](https://doi.org/10.1111/jog.13610)
87. Nakano, I. Garnier, D. Minata, M. Rak, J. (2015). Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells - Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 40: 17-26. [DOI: 10.1016/j.semcd.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.011)
88. Ng, E. K. O., Tsui, N. B. Y., Lau, T. K., Leung, T. N., Chiu, R. W. K., Panesar, N. S., Lo, Y. M. D. (2003). mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4748–4753. [DOI: 10.1073/pnas.0637450100](https://doi.org/10.1073/pnas.0637450100)
89. Oberacker P, Stepper P, Bond DM, Höhn S, Focken J, (2019). Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLOS Biology* 17(1): e3000107. [DOI: 10.1371/journal.pbio.3000107](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000107)
90. Orczyk-Pawilowicz, M., Jawien, E., Deja, S., Hirnle, L., Zabek, A., y Mlynarz, P. (2016). Metabolómica del líquido amniótico humano y del plasma materno durante el embarazo normal. *PloS one* , 11 (4), e0152740. [DOI: 10.1371/journal.pone.0152740](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152740)
91. Oszolak, F., & Milos, P. M. (2010). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews Genetics*, 12(2), 87-98. [DOI: 10.1038/nrg2934](https://doi.org/10.1038/nrg2934).RNA
92. Pan, M. Ge, Q. Li, H. Yang, Q. Lu, J. Zhang, D. Lu, Z. (2012). Sequencing the MiRNAs in Maternal Plasma from Women Before and After Parturition. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 12; 4035-4043. [DOI: 10.1166/jnn.2012.6196](https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6196)
93. Pasqualotto, F. F., Borges Júnior, E., Pasqualotto, E. B., (2008). The male biological clock is ticking: a review of the literature. *Sao Paulo Medical Journal*, 126 (3): 197–201.
94. Pinzani P., Salvianti F., Pazzagli, M.,Orlando, C. (2010). Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. *Methods*, 50(4), 302–307. [DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.02.004)
95. Podnar, J., Deiderick, Heather Huerta, G., Hunicke-Smith, S. (2014). Next-generation sequencing RNA-Seq library construction. *Current Protocols in Molecular Biology*. SUPPL.106: 1-19. [DOI: 10.1002/0471142727.mb0421s106](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0421s106)
96. Poirier C., Desgagné V., Guérin, R., & Bouchard, L. (2017). MicroRNAs in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus: Emerging Role in Maternal Metabolic Regulation. *Current Diabetes Reports*, 17(5). [DOI: 10.1007/s11892-017-0856-5](https://doi.org/10.1007/s11892-017-0856-5)
97. Puhan, M. A., Chandra, D., Mosenifar, Z., Ries, A., Make, B., Hansel, N. N., Centre, H. (2017). *HHS Public Access*, 37(4), 784–790. DOI:10.1183/09031936.00063810.The

98. Record, M. (2014). Intercellular communication by exosomes in placenta: A possible role in cell fusion. *Placenta*. 35; 297-302. DOI: [10.1016/j.placenta.2014.02.009](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.009)
99. Purizaca, M. (2010). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323428195010>. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 57–69.  
Recuperado de: [file:///C:/Users/PC/Downloads/PROTOCOLO/modificacionesfisiologicas en embarazo.pdf](file:///C:/Users/PC/Downloads/PROTOCOLO/modificacionesfisiologicas%20en%20embarazo.pdf)
100. Qiu C., Chen G., y Cui Q. (2012). Towards the understanding of microRNA and environmental factor interactions and their relationships to human diseases. *Scientific reports*, 2, 318. DOI:10.1038/srep00318
101. Rana TM. (2007). Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 23–36.
102. Rizvi, FN. Smith, FG. (2017). RNA as a small molecule druggable target. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*. 27: 5083- 5088. DOI: [10.1016/j.bmcl.2017.10.052](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.052)
103. Rubio M, Bustamante M, Hernandez-Ferrer C, Fernandez-Orth D, Pantano L, et al. (2018). Circulating miRNAs, isomiRs and small RNA clusters in human plasma and breast milk. *PLOS ONE* 13(3): e0193527 DOI: [10.1371/journal.pone.0193527](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193527)
104. Sabapatha, A., Gercel-taylor, C., & Taylor, D. D. (2006). Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *American Journal of Reproductive Immunology*, 56(5–6), 345–355. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00435.x
105. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7, 3. DOI: [10.1186/1471-2199-7-3](https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3)
106. Spornraft, M., Kirchner, B., Haase, B., Benes, V., Pfaffl, M. W., & Riedmaier, I. (2014). Optimization of Extraction of Circulating RNAs from Plasma Enabling Small RNA Sequencing. *PLoS ONE*, 9(9), e107259. DOI: [10.1371/journal.pone.0107259](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107259)
107. Sreekumar, P. G., Hinton D. R., Kannan R. (2011). Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. *World Journal of Biological Chemistry*. 2(8), 184. DOI: [10.4331/wjbc.v2.i8.184](https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i8.184)
108. Smith, C. J. y Osborn, M. A. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x)
109. Sonntag, K. C., & Woo, T. W. (2018). Laser microdissection and gene expression profiling in the human postmortem brain. *Handbook of clinical neurology*, 150, 263–272. DOI: [10.1016/B978-0-444-63639-3.00018-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63639-3.00018-9)
110. Tamaru S., Mizuno Y., Tochigi H. y Kajihara T. (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications MicroRNA-135b suppresses extravillous trophoblast-derived HTR-8 / SVneo cell invasion by directly down regulating CXCL12 under low oxygen conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2), 421–426. DOI: [10.1016/j.bbrc.2015.04.055](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.055)

111. Timofeeva, AV. Gusarm, VA. Kan, NE. Prozorovskaya, KN. Karapetyan, AO. Bayev, OR., Chagovets, VV. Kliver, SF. Iakovishina, DY. Frankevich, VE. Sukhikh, GT. (2017). Identification of potential early biomarkers of preeclampsia. *Placenta*. 61: 61-71. DOI: [10.1016/j.placenta.2017.11.011](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.11.011)
112. Tong, M., y Chamley L.W. (2015). Feto-Maternal Communication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, 1–17.
113. Truong G., Guanzon D., Kinhal V., Elfeky O., Lai A., Longo S., Salomon C. (2017). Oxygen tension regulates the miRNA profile and bioactivity of exosomes released from extravillous trophoblast cells Liquid biopsies for monitoring complications of pregnancy. *PLoS one*, 12(3), e0174514. DOI: [10.1371/journal.pone.0174514](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174514)
114. Tsochandaridis, M., Nasca L. Toga C., Levy-Mozziconacci A. (2015). Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. *BioMed research international*, 2015: 294954.
115. Ultimo, S., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., McCubrey, J. A., Capitani, S., & Neri, L. M. (2017). Cardiovascular disease-related miRNAs expression: potential role as biomarkers and effects of training exercise. *Oncotarget*, 9(24), 17238–17254. DOI: [10.18632/oncotarget.24428](https://doi.org/10.18632/oncotarget.24428)
116. Van Dijk, E L., Jaszczyszyn, Yan., Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research*. 322(1): 12-20. DOI: [10.1016/j.yexcr.2014.01.008](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.008)
117. Ventura W., Koide K., Hori K., Yotsumoto J., Sekizawa A., Saito H., y Okai, T. (2013). Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in early pregnancy loss. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 169(1), 28–32. DOI: [10.1016/j.ejogrb.2013.01.025](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.01.025)
118. Vickers K. C., Palmisano B. T., Shoucri B. M., Shamburek R. D., Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 13(4), 423–433. DOI: [10.1038/ncb2210](https://doi.org/10.1038/ncb2210)
119. Wadapurkar, MR y Vyas, R. 2018. Computational analysis of next generation sequencing data and its applications in clinical oncology. *Informatics in Medicine Unlocked*. 11,75-82. DOI: [10.1016/j.imu.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.05.003)
120. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57-63. DOI: [10.1038/nrg2484](https://doi.org/10.1038/nrg2484).RNA-Seq
121. Wang, Y., (2017). Vascular biology of the placenta. *Morgan y Claypool*. 73-75 (2). DOI: [10.4199/C00153ED1V01Y201704ISP075](https://doi.org/10.4199/C00153ED1V01Y201704ISP075)
122. Wessels, J. M. Edwards, A. K., Khalaj, K. Kridli, R. T. Bidarimath, M. y Tayade, C. (2013). The microRNAome of pregnancy: Deciphering miRNA networks at the maternal-fetal interface. *PLoS ONE*, 8(11), 1–14. DOI: [10.1371/journal.pone.0072264](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072264)
123. Williams, Z. Ben-Dov, I. Z., Elias, R., Mihailovic, A., Brown, M., Rosenwaks, Z., Tuschl, T. (2013). Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals

- biomarker potential and limitations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110; 11; 4255-4260. DOI: [10.1073/pnas.1214046110](https://doi.org/10.1073/pnas.1214046110)
124. Yang, Q., Lu, J., Wang, S. Li, H. Ge, Q., Lu, Z. (2011). Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clinica Chimica Acta*. 412: 2167-2173. DOI: [10.1016/j.cca.2011.07.029](https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.029)
125. Zeng, Z., Liu, F., & Li, S. (2017). Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70(1), 59–65. DOI: [10.1159/000459633](https://doi.org/10.1159/000459633)
126. Zhang C. (2009). Novel functions for small RNA molecules. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 11(6), 641–651
127. Zhao, K. (1999). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics Zhong. *Jiegou Huaxue*, 18(2), 136–140. DOI: [10.1038/nrg2484.RNA-Seq](https://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-Seq)
128. Zhu X., Han T., Sargent I. L., Yin G. y Yao Y. (2009). Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic. *Basic Science: obstetrics*, 200(6), 661.e1-661.e7. DOI: [10.1016/j.ajog.2008.12.045](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.12.045)
129. Zisoulis, D. G., Kai, Z. S., Chang, R. K., & Pasquinelli, A. E. (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature*, 486(7404), 541–544. DOI: [10.1038/nature11134](https://doi.org/10.1038/nature11134)

