



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS AL NACIMIENTO PRETÉRMINO**

**HUMANO EN POBLACIÓN MEXICANA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. CHÁVEZ ORTEGA JESÚS EDUARDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NOEMI MERAZ CRUZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA**  
LABORATORIO DE GENÓMICA FUNCIONAL DEL CÁNCER, INMEGEN  
**DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, 2023**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS AL NACIMIENTO PRETÉRMINO**

**HUMANO EN POBLACIÓN MEXICANA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. CHÁVEZ ORTEGA JESÚS EDUARDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NOEMI MERAZ CRUZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA**  
LABORATORIO DE GENÓMICA FUNCIONAL DEL CÁNCER, INMEGEN  
**DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, 2023**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1104/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **26 de septiembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **CHÁVEZ ORTEGA JESÚS EDUARDO** con número de cuenta **519020562** con la tesis titulada **“POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS AL NACIMIENTO PRETÉRMINO HUMANO EN POBLACIÓN MEXICANA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NOEMI MERAZ CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FEDERICO ANDRÉS SÁNCHEZ QUINTO  
Vocal: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO  
Vocal: M. EN C. AURORA ESPEJEL NÚÑEZ  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ  
Secretario: DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 05 de diciembre de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos institucionales**

**Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y a la Facultad de Medicina, por los apoyos de todo tipo recibidos durante mi formación académica y por haberme dado la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis, bajo sus instalaciones.**

**También agradezco el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), quien me otorgó la “Beca Nacional para Estudios de Posgrado”, la cual me permitió concluir mis estudios de maestría (No. de CVU: 959540).**

**Este trabajo fue realizado gracias al presupuesto asignado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, al proyecto titulado: “Polimorfismos de genes asociados al nacimiento pretérmino humano en población mexicana” con el No. IN210420.**

**Particularmente, agradezco inmensamente a la Dra. Noemi Meraz Cruz, mi maestra, por su paciencia, tiempo y enseñanzas durante mis estudios, ya que a partir de sus observaciones y apoyo absoluto, se pudo concluir el presente trabajo.**

**A los miembros del comité tutorial: la Dra Magali Espinosa Castilla y la Dra. Sara Frias Vázquez, quienes con sus comentarios ayudaron a mejorar la comprensión de la tesis.**

## **Agradecimientos personales**

**Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. María del Carmen García de León Méndez, por brindarme su valiosa orientación, tiempo y conocimiento para poder concluir el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias por su amabilidad y la disposición que siempre tuvo para ayudarme, así como los ánimos que me brindó cuando más lo necesité.**

## **Agradecimientos personales**

**Agradezco a Díos, a mis padres, a mi familia, a mi tutora de tesis, a mi comité tutorial, a los integrantes del jurado de examen, a mis amistades, al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, a la Facultad de Medicina de la UNAM, al Instituto Nacional de Medicina Genómica, y a todas aquellas personas que durante estos años me han brindado su confianza, tiempo, ayuda y enseñanzas para que yo pudiera realizar mis sueños, ya que sin ellos este logro no sería posible.**

Dr. Felipe Vadillo Ortega

Dra. Berenice Palacios González

Dr. Rafael de Jesús Nambo Venegas

Dr. Alfredo Mendoza Vargas

Dr. Luis Leonardo Flores Lagunes

Dra. Myrna Godínes Enríquez

Lic. Haydee Miranda Ortiz

**A mis compañeros del laboratorio de Vinculación Científica, quienes me brindaron su tiempo cuando lo necesité.**

Dr. (c). Daniel Eduardo Sandoval Colín

Lic. Cristian Jesús González Colín

**Dra. Noemi Meraz Cruz**

**Dr. Felipe Vadillo Ortega**

**Gracias por recibirme en su laboratorio, por sus enseñanzas, por la confianza recibida y por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo durante estos años.**

## **Dedicatoria**

**A mi madre María Eugenia del Rosario Ortega  
Cortéz y a la memoria de mi padre**

**Jesús Chávez Chávez**

A quienes agradezco infinitamente por haberme dado su apoyo incondicional durante toda mi formación académica y quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro. Son mi orgullo y sin ustedes nada de esto sería posible.

# ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

Resumen .....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Etiología.....	7
1.2. Diagnóstico del NPT .....	13
2. Antecedentes.....	16
3. Planteamiento del problema.....	17
4. Hipótesis .....	17
5. Objetivo general .....	18
6. Objetivos específicos .....	18
7. Metodología .....	19
7.1 Muestras biológicas .....	19
7.2 Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos.....	21
7.3 Diseño de genes candidatos y sondas de captura .....	24
7.4 Secuenciación y genotipificación .....	25
7.5 Análisis estadístico .....	27
8. Resultados .....	28
8.1 Grupos de estudio .....	28
8.2 Banco de muestras.....	30
8.3 Genes candidatos .....	30
8.4 Total de SNPs identificados.....	30

8.5 SNPs en equilibrio de Hardy-Weinberg.....	31
9. Discusión .....	52
10. Conclusión.....	60
12. Referencias bibliográficas.....	61
Bibliografía I. Carta de consentimiento informado .....	72
Bibliografía II. Protocolo de enriquecimiento de objetivos (Haloplex) .....	76

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Rutas biológicas implicadas en el NPT .....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 2. Relación del número de casos con respecto a las semanas de gestación .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 3. Procesamiento y agrupación de muestras .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 4. SNPs localizados en genes de membrana celular .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5. SNPs localizados en genes citoplasmáticos .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 6. SNPs localizados en genes extracelulares .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 7. SNP localizado en gen nuclear .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 8. SNPs localizados en genes involucrados con la movilización de calcio intracelular .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 9. SNPs localizados en genes asociados con la hidroxilación del triptófano y transporte de serotonina .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 10. SNPs identificados con respecto a las SDG .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11. Proteínas codificadas por genes asociados al NPT tardío y extremo .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 12. Diferencias en la localización de SNPs en el gen de IL-1<math>\beta</math> .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 13. Interacción de proteínas codificadas por genes asociados al NPT .....</b>	<b>59</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Biomarcadores para predecir el NPT .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 2. Características del SNP .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 3. Características de las mujeres que conforman los grupos de estudio .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 4. Genes candidatos asociados con el proceso inflamatorio y el NPT .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 5. SNPs presentes en mujeres con desenlace pretérmino .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 6. Frecuencia genotípica y del alelo menor de cada SNP asociado con el NPT .....</b>	<b>48</b>

## Abreviaturas

<b>ADRA2C</b>	Receptor adrenérgico alfa 2C (del inglés: <i>adrenoceptor alpha 2C</i> )
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa (del inglés: <i>Adrenocorticotropic hormone</i> )
<b>ATG16L1</b>	Proteína relacionada con la autofagia (del inglés: <i>autophagy related 16 like 1</i> )
<b>APP</b>	Amenaza de parto pretérmino
<b>CACNA1C</b>	Canal de calcio dependiente de voltaje tipo alfa-1C (del inglés: <i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C</i> )
<b>CARD8</b>	Proteína 8 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa (del inglés: <i>caspase recruitment domain family member 8</i> )
<b>CD14</b>	Antígeno de diferenciación de monocitos (del inglés: <i>CD14 molecule</i> )
<b>CNR1</b>	Receptor cannabinoide 1 (del inglés: <i>cannabinoid receptor 1</i> )
<b>CNR2</b>	Receptor cannabinoide 2 (del inglés: <i>cannabinoid receptor 2</i> )
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina (del inglés: <i>corticotropin-releasing hormone</i> )
<b>DAMPS</b>	Patrones moleculares asociados al daño (del inglés: <i>damage-associated molecular patterns</i> )
<b>EHW</b>	Equilibrio de Hardy-Weinberg
<b>FGFR4</b>	Receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés: <i>fibroblast growth factor receptor 4</i> )
<b>FNF</b>	Fibronectina fetal
<b>FUM</b>	Fecha de última menstruación
<b>GNB3</b>	Proteína de unión a nucleótidos de guanina (del inglés: <i>G protein subunit beta 3</i> )
<b>HTR2A</b>	Receptor de 5-hidroxitriptamina 2A (del inglés: <i>5-hydroxytryptamine receptor 2A</i> )
<b>ICAM1</b>	Molécula de adhesión intercelular (del inglés: <i>intercellular adhesion molecule 1</i> )
<b>IFN-<math>\alpha</math>2</b>	Interferón alfa 2 (del inglés: <i>interferon alpha 2</i> )

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina 1 alfa (del inglés: <i>interleukin 1 alpha</i> )
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta (del inglés: <i>interleukin 1 beta</i> )
<b>IL-1R1</b>	Receptor de interleucina 1 tipo 1 (del inglés: <i>interleukin 1 receptor type 1</i> )
<b>IL-1RN</b>	Antagonista del receptor de interleucina 1 (del inglés: <i>interleukin 1 receptor antagonist</i> )
<b>IL-4R</b>	Receptor de interleucina 4 (del inglés: <i>interleukin 4 receptor</i> )
<b>IL-6</b>	Interleucina 6 (del inglés: <i>interleukin 6</i> )
<b>IL-6R</b>	Receptor de interleucina 6 (del inglés: <i>interleukin 6 receptor</i> )
<b>IL-8</b>	Interleucina 8 (del inglés: <i>interleukin 8</i> )
<b>IL-10</b>	Interleucina 10 (del inglés: <i>interleukin 10</i> )
<b>IL-12B</b>	Interleucina 12 B (del inglés: <i>interleukin 12 B</i> )
<b>IL-23<math>\alpha</math></b>	Interleucina 23 alfa (del inglés: <i>interleukin 23 alpha</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteasa
<b>MYO9<math>\beta</math></b>	Cadena ligera de miosina IX Beta (del inglés: <i>myosin IX beta</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B (del inglés: <i>nuclear factor kappa B</i> )
<b>NOD1</b>	Proteína 1 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 1 (del inglés: <i>nucleotide binding oligomerization domain containing 1</i> )
<b>NOD2</b>	Proteína 2 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (del inglés: <i>nucleotide binding oligomerization domain containing 2</i> )
<b>NT</b>	Nacimiento a término
<b>NPT</b>	Nacimiento pretérmino
<b>ROXT</b>	Receptor de oxitocina
<b>OR</b>	Razón de momios (del inglés: <i>odds ratio</i> )
<b>PAMPS</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés: <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>RRP</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>PTGER4</b>	Receptor 4 de prostaglandinas E2 (del inglés: <i>prostaglandin E receptor 4</i> )

<b>PTPN2</b>	Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 2 (del inglés: <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2</i> )
<b>RCF</b>	Restricción del crecimiento fetal
<b>RPM</b>	Ruptura prematura de membranas
<b>SDG</b>	Semanas de gestación
<b>SLC22A4</b>	Transportador de cationes orgánicos (del inglés: <i>solute carrier family 22 member 4</i> )
<b>SLC22A5</b>	Transportador de carnitina (del inglés: <i>solute carrier family 22 member 5</i> )
<b>SLC51A</b>	Transportador de ácidos biliares (del inglés: <i>solute carrier family 51 subunit alpha</i> )
<b>SLC6A2</b>	Transportador de noradrenalina (del inglés: <i>solute carrier family 6 member 2</i> )
<b>SLC6A4</b>	Transportador de serotonina (del inglés: <i>solute carrier family 6 member 4</i> )
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés: <i>single nucleotide polymorphism</i> )
<b>TLR3</b>	Receptor 3 tipo toll (del inglés: <i>toll like receptor 3</i> )
<b>TLR4</b>	Receptor 4 tipo toll (del inglés: <i>toll like receptor 4</i> )
<b>TLR5</b>	Receptor 5 tipo toll (del inglés: <i>toll like receptor 5</i> )
<b>TLR9</b>	Receptor 9 tipo toll (del inglés: <i>toll like receptor 9</i> )
<b>TNFSF15</b>	Miembro 15 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (del inglés: <i>TNF superfamily member 15</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TPH1</b>	Triptófano hidroxilasa 1 (del inglés: <i>tryptophan hydroxylase 1</i> )
<b>TPH2</b>	Triptófano hidroxilasa 2 (del inglés: <i>tryptophan hydroxylase 2</i> )

## Resumen

El nacimiento pretérmino (NPT) se refiere al nacimiento de un recién nacido vivo, que ocurre antes de completar las 37 semanas de gestación. Representa la primera causa de muerte en los primeros 28 días de vida (periodo neonatal) y la segunda en menores de cinco años. La causa específica del NPT es aún desconocida. Ciertos factores de riesgo como la inflamación y los factores genéticos, pueden aumentar la probabilidad de este desenlace. Existe evidencia a nivel mundial de polimorfismos en genes inflamatorios asociados con el NPT. Sin embargo, en México, no existen reportes de búsqueda de SNPs asociados con este evento a partir de un diseño personalizado de genes candidatos.

**Objetivo:** Identificar polimorfismos en genes que participan en la respuesta inflamatoria asociados con el desarrollo del NPT.

**Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio de casos y controles, que incluyó 57 mujeres con desenlace de NPT y 153 a término. Se aisló DNA a partir de muestras de saliva y se verificó su calidad e integridad. Se diseñó un microarreglo personalizado de 42 genes asociados con la respuesta inflamatoria, y se utilizó el kit de "Haloplex" para capturar las sondas de hibridación de los genes diseñados. Posteriormente, las sondas enriquecidas fueron secuenciadas con la plataforma "Miseq" de Illumina para obtener archivos con extensión "FASTQ", los cuales se analizaron con el programa "SureCall" para identificar las variantes genéticas en casos y controles. Las diferencias en las características descriptivas de los grupos de estudio se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y t-student. Las pruebas de Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) se realizaron para cada SNP en el grupo control. Después se identificaron los SNPs únicos y compartidos de casos y controles utilizando un diagrama de Venn. Las diferencias en la distribución de los genotipos y frecuencias alélicas se compararon entre los grupos, utilizando la prueba de chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), mientras que la fuerza de asociación se midió con la prueba de odds ratio (OR).

**Resultados:** Los resultados obtenidos identificaron 6 SNPs para el gen *CARD8*, 8 para *IL-4R*, 4 para *ATG16L1* y 1 para cada uno de los siguientes genes: *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL6R*, *NF- $\kappa$ B*, *NOD1* y *NOD2*. Todos los SNPs mencionados mostraron OR  $\geq 2$ , estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). De forma adicional para estos genes, se logró identificar 24 genotipos y alelos menores asociados significativamente con el NPT y con mayor riesgo. Además, se identificó un grupo de SNPs con alta prevalencia que solo estaban presentes en las mujeres que desarrollaron NPT: 4 para *CARD8*, 2 para *PTPN2* y 1 por cada gen siguiente: *TNF- $\alpha$* , *IL-1R1*, *IL-6*, *IL-12B*, *NF- $\kappa$ B*, *TLR4* y *TLR5*.

La mayor cantidad de SNPs identificados en este estudio, se encontró en los genes *CARD8* e *IL-4R*, con un total 20 y 13 SNPs respectivamente. Por otro lado, la región con mayor cantidad de SNPs detectados, se observó en la región 3'-UTR, principalmente en los genes de *IL-6R*, *ATG16L1* y *TNF- $\alpha$* .

**Conclusión:** Los resultados obtenidos en este estudio, son los primeros en identificar SNPs de genes inflamatorios maternos que incrementan la susceptibilidad para el desarrollo del NPT en un grupo de mujeres mexicanas.

**Palabras clave:** alelo, asociación genética, genotipo, inflamación, nacimiento pretérmino, polimorfismo.

## Abstract

Preterm birth (PTB) refers to the birth of a live newborn, which occurs before completing 37 weeks of gestation. It represents the first cause of death in the first 28 days of life (neonatal period) and the second in children under five years of age. The specific cause of PTB is still unknown. Certain risk factors, such as inflammation and genetic factors, may increase the likelihood of this outcome. There is worldwide evidence of polymorphisms in inflammatory genes associated with PTB. However, in Mexico, there are no reports of searching for SNPs associated with this event based on a personalized design of candidate genes.

**Objective:** Identify polymorphisms in genes that participate in the inflammatory response associated with the development of PTB.

**Materials and Methods:** A case-control study was carried out, which included 57 women with an outcome of PTB and 153 at term. DNA was isolated from saliva samples and its quality and integrity were verified. A custom microarray of 42 genes associated with the inflammatory response was designed, and the "Haloplex" kit was used to capture the hybridization probes of the designed genes. Subsequently, the enriched probes were sequenced with the Illumina "Miseq" platform to obtain files with the "FASTQ" extension, which were analyzed with the "SureCall" program to identify genetic variants in cases and controls. The differences in the descriptive characteristics of the study groups were analyzed with the Mann-Whitney U test and t-student. Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) tests were performed for each SNP in the control group. The unique and shared SNPs of cases and controls were then identified using a Venn diagram. Differences in the distribution of genotypes and allelic frequencies were compared between groups using Pearson's chi-square test ( $\chi^2$ ), while the strength of association was measured with the odds ratio (OR) test.

**Results:** The results obtained identified 6 SNPs for the *CARD8* gene, 8 for *IL-4R*, 4 for *ATG16L1* and 1 for each of the following genes: *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL6R*, *NF- $\kappa$ B*, *NOD1* and *NOD2*. All the mentioned SNPs showed  $OR \geq 2$ , statistically significant ( $p < 0.05$ ). Additionally, for these genes, it was possible to identify 24 genotypes and minor

alleles significantly associated with PTB and with higher risk. In addition, a group of SNPs with high prevalence that were only present in women who developed PTB was identified: 4 for *CARD8*, 2 for *PTPN2* and 1 for each of the following genes: *TNF- $\alpha$* , *IL-1R1*, *IL-6*, *IL-12B*, *NF- $\kappa$ B*, *TLR4* and *TLR5*.

The largest number of SNPs identified in our study were found in the *CARD8* and *IL-4R* genes, with a total of 20 and 13 SNPs, respectively. On the other hand, the region with the highest number of SNPs detected was observed in the 3'-UTR region, mainly in the *IL-6R*, *ATG16L1* and *TNF- $\alpha$*  genes.

**Conclusion:** The results obtained in this study are the first to identify SNPs of maternal inflammatory genes that increase susceptibility to the development of PTB in a group of mexican women.

**Keywords:** allele, genetic association, genotype, inflammation, polymorphism, preterm birth

## 1. Introducción

De acuerdo con la OMS, el término nacimiento pretérmino (NPT) se refiere al nacimiento de un recién nacido vivo, que ocurre antes de completar las 37 semanas de gestación (SDG), y se clasifica de acuerdo con la edad gestacional del nacimiento como extremadamente prematuro (<28 SDG), muy prematuro (28 a <32), moderado (32 a <34) y tardío (34 a <37) (WHO, 2018; Walani, 2020). De acuerdo a su presentación clínica se ha dividido en tres grupos etiológicos (Souza y Cecatti, 2020): 1) NPT espontáneo o idiopático, que representa del 65 al 70% de toda la prematuridad (Deressa y cols., 2018), se caracteriza por presentar un trabajo de parto espontáneo sin causa clínica identificable; 2) NPT con ruptura prematura de membranas (RPM), que ocurre aproximadamente en un 40% de todos los casos, cuya característica es la ruptura de membranas con salida de líquido amniótico de la cavidad uterina (Menon y Richardson, 2017), y 3) NPT con inducción de trabajo de parto (iatrogénico) (Simmons y cols., 2010) debido a factores maternos (desprendimiento placentario (Downes y cols., 2017), gestaciones múltiples (Burger y cols., 2021), RPM anterior (Lee y cols., 2003) y factores cervicales o fetales (Hamou y cols., 2020)), el cual representa el 30% de los casos (Deressa y cols., 2018).

El NPT se considera el problema clínico más importante en obstetricia y medicina neonatal. Es responsable del 18% de la mortalidad mundial con aproximadamente un millón de muertes prematuras al año (Walani, 2020). El riesgo de muerte para un recién nacido pretérmino tardío se incrementa 5.9 veces durante el periodo neonatal, en comparación con los recién nacidos a término (RR: 5,9; IC: 5-6,9) (Karnati y cols., 2020).

En México, de acuerdo con cifras del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), durante el año 2019, se reportó una tasa de prematuridad del 9.7% (CEVECE, 2019). Sin embargo, instituciones de referencia en atención de embarazos de alto riesgo como el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), reportó un porcentaje del 31.3% (Coria, 2022).

La prematuridad tiene consecuencias a corto y a largo plazo para los lactantes afectados (Karnati y cols., 2020) y puede dejar a estos individuos con discapacidades de por vida, incluso después de haberse implementado las intervenciones disponibles (Murray y cols., 2017; Padeh y cols., 2019).

La morbilidad y mortalidad son más altas entre los recién nacidos definidos como "muy prematuros" y "extremadamente prematuros", la probabilidad de supervivencia es menor a medida que disminuye la edad gestacional, con un 94% para los nacidos a las 28 semanas y del 6% para los nacidos a las 22 SDG (Anderson y cols., 2016). También los trastornos psicopatológicos y discapacidades en los supervivientes de la prematuridad extrema han reportado tasas de parálisis cerebral en la infancia de un 70 a 80% (Pinto y cols., 2018), que pueden repercutir en la vida social y académica de los infantes (Natarajan y Shankaran, 2016).

A los niños nacidos pretérmino, también se les ha asociado con mayor probabilidad de experimentar problemas de salud durante la adolescencia y la vida adulta. Las consecuencias observadas en adultos jóvenes de 20 a 36 años incluyen trastornos como: diabetes tipo 2, asma, menor capacidad cognitiva y trastornos relacionados con la salud mental (Karnati y cols., 2020).

Las secuelas adversas resultantes del NPT imponen una carga económica considerable por los servicios de atención médica a nivel mundial y nacional. En Estados Unidos, el costo estimado derivado de la hospitalización inicial para un NPT oscila en los \$26,000.00 dólares (USD), en comparación con el gasto de \$2,000.00 (USD) que se tiene con un recién nacido a término (Karnati y cols., 2020). Mientras que en México, el costo directo por atención médica para la prematuridad en las unidades de segundo y tercer nivel de atención es de aproximadamente \$1,726.00 USD diarios (COMEGO, 2015).

## 1.1. Etiología

Al NPT se le considera un síndrome de origen multifactorial, ya que es el resultado de distintos factores, entre ellos: los *sociodemográficos* (estado socioeconómico, estado civil, edad), *ambientales* (contaminantes dentro y fuera del hogar), *condiciones médicas del embarazo* (gestaciones múltiples, embarazos gemelares, hipertensión, traumatismos), y por último *factores biológicos*, entre los que se encuentran la sobre-distensión uterina (Mendelson y cols., 2019), hemorragia decidual (Nishimura y cols., 2020), estrés materno-fetal (Wadhwa y cols., 2011; Latendresse, 2009; NG P, 2000), inflamación y los factores genéticos (Sheikh y cols., 2016).

### Factores biológicos

Entre los factores de riesgo, los factores biológicos desempeñan un papel importante en el inicio del NPT, ya que la interacción de las rutas biológicas, coincide al final en la expresión de un conjunto de genes implicados en la inflamación (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) y la contracción del ambiente uterino (COX2, PGE2, MMP), los cuales, una vez activados, pueden desencadenar el desarrollo del NPT al actuar sobre tejidos blanco del trabajo de parto (membranas fetales, placenta y endometrio) (Fig. 1). Sin embargo, entre los factores antes mencionados, la inflamación del ambiente uterino y los factores genéticos parecen ser cada vez más relevantes para la prematurez.

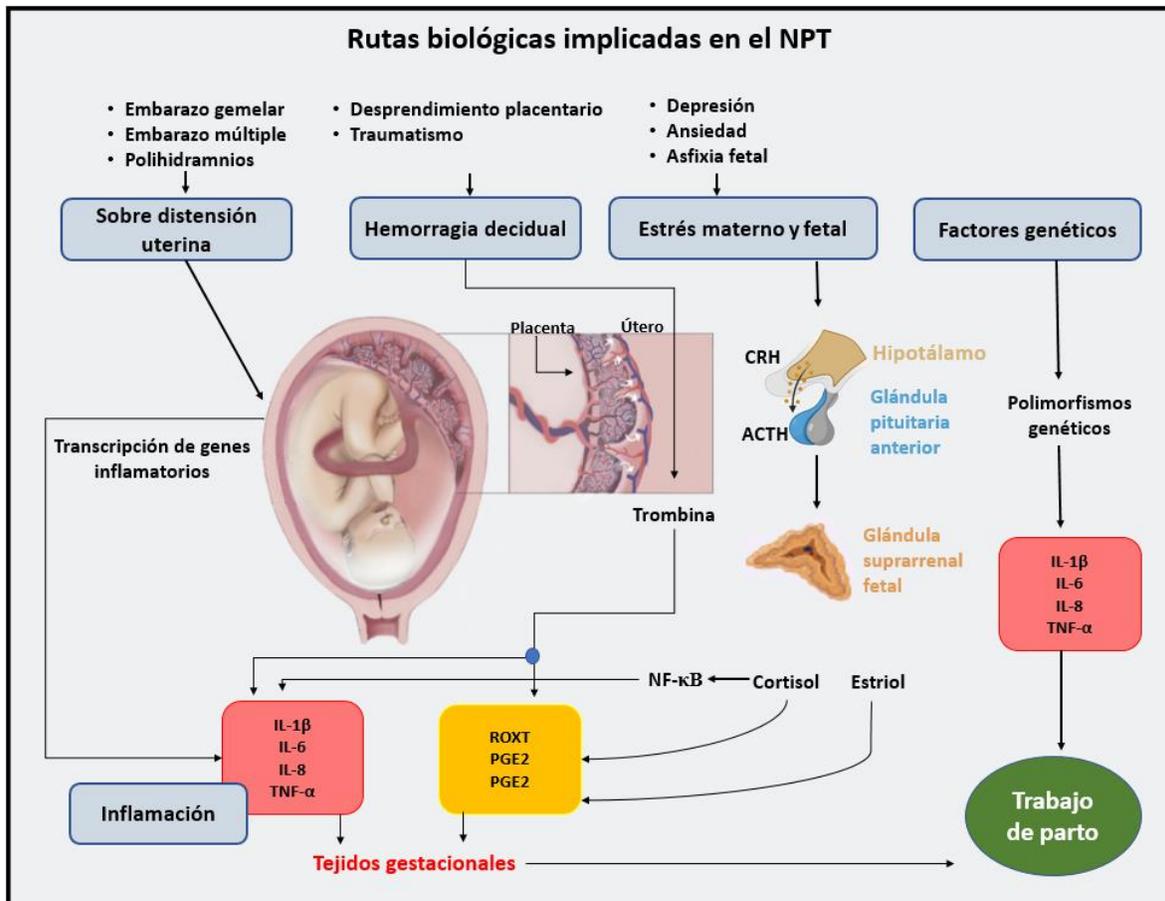


Figura 1. Se muestran las rutas biológicas y su mecanismo fisiopatológico implicado en el desarrollo del NPT.

## Inflamación en el ambiente uterino

La inflamación ocasionada por las infecciones microbianas cervicovaginales y/o intrauterinas, es considerada como el principal factor causal de este problema obstétrico, ya que representa del 25 al 40% de los casos con NPT (Sheikh y cols., 2016) y hasta el 79% de la prematuridad extrema (Cappelletti y cols., 2016). Las infecciones, inducen la activación de la respuesta inmune innata, dirigida por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mediante los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), ubicados en el tejido materno y fetal. Este reconocimiento conlleva a la activación de diferentes cascadas de moléculas inflamatorias, semejantes a las derivadas de las rutas biológicas

mencionadas con anterioridad. Lo que sugiere el papel tan importante que tienen estos genes sobre la patología de NPT.

Un elemento importante que ha encaminado el estudio del NPT hacia una predisposición genética, es que en algunos casos la inflamación en la cavidad uterina representa un proceso inflamatorio estéril (ausencia de microorganismos) (Gomez-Lopez y cols., 2016). La activación de la respuesta inflamatoria se lleva a cabo a partir de la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) como: la proteína del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1), el DNA fetal libre de células (cfDNA) y el factor activador de plaquetas (PAF), los cuales son liberados durante el estrés oxidativo, el sufrimiento fetal y el daño tisular (Kemp M, 2014). Estas moléculas interactúan con receptores de reconocimiento de patrones, iniciando la cascada de señalización inflamatoria que desemboca en un NPT.

Aún permanece sin ser resuelto, ¿Cómo se logra la activación de estas rutas fisiopatológicas y quiénes inician los eventos clínicos del proceso del NPT? Lo que parece más probable es que no todos los casos clínicos resultan de la activación de los mismos mecanismos biológicos. Esto permite suponer que las variaciones individuales aportan diferentes combinaciones de mecanismos, que actuando en proporciones variables conducen al mismo fenómeno clínico (Tosto y cols., 2020).

### **Factores genéticos**

Los estudios familiares, la disparidad racial y la presencia de polimorfismos, han sugerido la existencia de la influencia genética sobre la duración de la gestación y el riesgo de desarrollar NPT, mostrando una clara predisposición materna para esta patología (Zhang y cols., 2018).

### **Agregación familiar**

Entre los factores de riesgo para que se presente el NPT, el antecedente más importante es la ocurrencia de un NPT anterior (Boyd y cols., 2009). De acuerdo

con datos publicados por Porter y cols. (1997), las mujeres que nacieron mediante un NPT tienen más probabilidades de que su embarazo tenga un desenlace pretérmino, incluso con la misma edad gestacional en la cual ellas nacieron. También muestra que a medida que disminuye la edad gestacional de las madres al nacer, la probabilidad de riesgo de NPT para su propia descendencia aumenta significativamente, lo que indica una relación inversamente proporcional entre las SDG y el riesgo de prematuridad.

Los estudios familiares también han mostrado que las mujeres con madres, hermanos y medias hermanas maternas que dieron a luz de manera similar, tienen un incremento del 80% en el riesgo de desarrollar NPT (Sheikh y cols., 2016). Sin embargo, el riesgo no se ve afectado por la ocurrencia de NPT en medias hermanas paternas de la mujer o en miembros de la familia de su pareja, lo que sugiere que parte sustancial del riesgo genético es proporcionado a través del linaje femenino en donde están involucrados los genes maternos (Boyd y cols., 2009; Svensson y cols., 2009; Wilcox y cols., 2008). Por otra parte, los estudios de gemelos que utilizan datos de nacimiento en diferentes países, mostraron de manera consistente que aproximadamente del 30 al 40% de la variación en la duración de la gestación, es atribuible a factores genéticos resultado de una interacción combinada entre los genomas materno y fetal (Strauss y cols., 2018).

### **Disparidad racial**

Un hallazgo consistente en todos los estudios que lo han abordado, es la disparidad de la prevalencia del NPT en diferentes poblaciones. Así en Estados Unidos de América (Oliveira y cols., 2019), la prevalencia de este problema es representado por el 18.4% en mujeres afroamericanas, 10.4% en mujeres con fondo genético latino (Bediako y cols., 2015) y 9% en mujeres de ascendencia europea (Burriss y cols., 2019). Las tasas de prevalencia muestran que las mujeres afroamericanas (en comparación con mujeres eurodescendientes) son un factor de riesgo constante para la prematuridad y los resultados adversos del embarazo. En una revisión sistemática de 30 estudios, se encontró que las mujeres afroamericanas tenían un

riesgo 2 veces mayor de presentar NPT (IC del 95%: 1.8–2.2; razón de posibilidades combinada) en comparación con las mujeres de ascendencia europea (Manuck, 2017). Mientras que la población latina comparada con mujeres eurodescendientes presentó un riesgo de casi el doble de culminar con esta enfermedad.

Estas diferencias biológicas producto de la racialización de estas poblaciones no pueden ser explicadas de manera completa por variables socioeconómicas o culturales, ya que podrían ser el resultado de las distintas frecuencias de alelos en el genoma de cada población, lo que sugiere que la variación genética entre los individuos es un componente clave de este proceso patológico multifactorial, que podría explicar las diferencias en las tasas de prevalencia entre poblaciones con diferentes orígenes demográficos.

### **Polimorfismos genéticos**

El papel del sistema inmune y en especial la respuesta inflamatoria materna, ha sido ampliamente estudiada como un factor que puede desencadenar la patogénesis del NPT. En los últimos años, los análisis de variación genética en estudios de secuenciación del genoma y exoma completo han identificado una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes relacionados con la inmunidad y la inflamación, en familias de mujeres embarazadas que experimentan NPT recurrente. La gran mayoría de la variación genética reportada ha sido encontrada en genes de citocinas y sus receptores, encargados de mediar la respuesta inflamatoria en el complejo uteroplacentario y en las membranas fetales. La variabilidad en estas regiones del genoma puede causar una alteración en la expresión de estas proteínas, provocando una respuesta insuficiente o exacerbada que puede aumentar el riesgo de NPT. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, los resultados hasta la fecha no han sido concluyentes, ya que han presentado inconsistencias en su replicación en diferentes poblaciones del mundo, por lo que la predisposición genética sigue sin estar clara (Frey y cols., 2016).

Para respaldar el concepto de que la inflamación juega un papel central en los mecanismos que conducen al NPT, a continuación, se presentan una serie de SNPs reportados en genes que codifican mediadores inmunitarios innatos, asociados en mujeres con culminación de embarazo prematuro.

El gen de IL-1 $\beta$  codifica una citocina proinflamatoria que es secretada por leucocitos y células endoteliales en respuesta a estímulos estériles e infecciosos. En mujeres latinas se evaluó la frecuencia alélica del SNP sinónimo “rs1143634” de IL-1 $\beta$  que causa un cambio de Citocina por Adenina (C>T), el cual se asoció con NPT (Romero y cols., 2010), mientras que, en población polaca este SNP no confirió riesgo (Kalinka y Bitner, 2009).

IL-6 es otra citocina proinflamatoria liberada por células T y macrófagos en respuesta a infecciones bacterianas o lesiones tisulares. En mujeres afroamericanas con NPT, al estudiar los SNPs promotores “rs1800797” (A>G) y “rs12700386” (C>G), se encontró que la formación del haplotipo para el alelo de riesgo (rs1800797-rs12700386) estaba asociado con el incremento en la concentración de IL-6 (Velez y cols., 2008). Por otro lado, las variaciones genéticas en este gen han mostrado disparidad diferencial de asociación al NPT entre diferentes poblaciones. Pereyra y cols. (2015) en población uruguaya, descubrió que la interacción del genotipo fetal heterocigoto (CG) para el SNP de IL-6 “rs1800795” (C>G) junto el genotipo materno homocigoto (GG) para el SNP de IL-1 $\beta$  “rs16944” (A>G), fue significativamente mayor en casos con NPT, en comparación a los controles. Mientras que, en población polaca el transporte materno del alelo 2 de IL-1RN (IL-1RN2) combinado con el genotipo homocigoto (GG) y heterocigoto (GC) del SNP promotor “rs1800796” (G>C) de IL-6, multiplicó el riesgo de NPT (Kalinka y Bitner, 2009). El gen TNF- $\alpha$  también muestra una variabilidad significativa entre los individuos de diferentes poblaciones. Los estudios han demostrado que el SNP homocigoto (AA) para “rs1800629” (G>A) en mujeres estadounidenses, estaba asociado con una duración más corta de la gestación

(Harper y cols., 2011), en comparación con individuos indonesios que no reportaron asociación para este SNP (Andalas y cols., 2015).

El papel de las citocinas antiinflamatorias es crucial para el inicio y el mantenimiento del embarazo, ya que participan en el proceso de implantación uterina, la placentación y la tolerancia fetal, al limitar la respuesta inmune y la inflamación local. En un estudio de Murtha y cols. (2006), se encontró que el SNP de repetición en tándem de 86 pb (con dos repeticiones) presente en el intrón 2 de IL-1RN en mujeres eurodescendientes que portaban al menos una copia del alelo de riesgo, se asociaban con NPT con y sin RPM.

La diferencia en la prevalencia del NPT en las distintas poblaciones, la disparidad racial, los factores sociodemográficos y la falta de una etiología bien definida, es una limitante importante para predecir un NPT inminente, ya que dificulta establecer medidas preventivas que sean eficaces en la detección de mujeres con amenaza de esta patología. La identificación temprana de mujeres con riesgo, puede brindar una atención médica personalizada, reducir sus costos, la morbilidad y las secuelas a corto y largo plazo.

## **1.2. Diagnóstico del NPT**

Con el objetivo de mejorar la salud de la mujer durante el embarazo y disminuir los resultados discapacitantes en los recién nacidos pretérmino, las estrategias tomadas por instituciones de salud pública se han encaminado en la identificación temprana de las mujeres con amenaza de parto pretérmino (APP), partiendo de la evaluación de los factores de riesgo asociados a esta patología. Este enfoque conduce a tratamientos preventivos y efectivos que pueden mejorar la atención perinatal y apoyar el desarrollo posnatal del lactante, reduciendo los costos y resultados adversos entre los prematuros.

Actualmente el diagnóstico clínico utilizado para identificar a mujeres con APP está basado en:

1) *La revisión del historial gineco-obstétrico de la paciente*, en donde se busca identificar factores de riesgo como: NPT previo, aborto recurrente, anomalías uterinas, incompetencia cervical y RPM.

2) *Exploración digital del cervix por ultrasonografía*, en donde se evalúa la dilatación > 3 cm, el borramiento ( $\geq 80\%$ ) y longitud (< a 25 mm antes de las 22 SDG).

3) *Síntomas referidos por la paciente* como son: contracciones uterinas regulares (2/10 min, 4/20 min, 8/60 min), dolor lumbar, presión pélvica y cambios en la secreción vaginal (pérdida de líquido vía vaginal).

A pesar de contar con todas estas pruebas diagnósticas, los valores de sensibilidad que ofrecen por lo regular son muy bajos, ya que los criterios utilizados son subjetivos y varían enormemente de un observador a otro.

### **Empleo de biomarcadores**

El desarrollo del conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos del NPT ha permitido proponer algunos marcadores moleculares localizados en fluidos corporales como suero, plasma, líquido amniótico y secreciones vaginales, para evaluar de forma más precisa el riesgo de un NPT.

En la Tabla 1, se muestran algunos biomarcadores que han sido asociados con el desenlace de NPT entre las semanas 22 a 34 de gestación.

**Tabla 1.** Se muestran los biomarcadores usados a nivel mundial para predecir el desenlace del NPT. VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo.

<b>Biomarcadores para predecir el NPT</b>				
<b>Biomarcador</b>	<b>Muestra</b>	<b>VPP %</b>	<b>VPN%</b>	<b>Referencia</b>
Alfa macroglobulina 1 placentaria (PAMG-1)	Fluido cervical	29	87	Figo, 2019
Alfa feto proteína	Fluido cervical	17.1	96.4	Basbug y cols., 2017
Estriol en saliva	Saliva	100	72	Ibrahim y cols., 2018
Factor de crecimiento placentario (PIGF)	Suero materno	96.4	75.6	Bremner y cols., 2022
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Suero materno	86	62	Zeng y cols., 2021
Fibronectina fetal (FNF)	Fluido cervical	25.8	87	Jun y cols., 2019
IL-1 $\beta$	Fluido cervical	68	79	Reyna-Villasmil y cols., 2017
IL-6	Fluido cervical	13.5	94.8	Reyna-Villasmil y cols., 2016
IL-8	Suero materno	85.7	93.4	Shahshahan y Hashemi, 2014
MMP-8	Fluido cervical	10.5	94.6	Reyna-Villasmil y cols., 2017
MMP-9	Líquido amniótico	67.9	78.8	Kim y cols., 2020
Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP-1)	Fluido cervical	84.4	95	Oskovi Kaplan y Ozgu-Erdinc, 2018
Tirosina cinasa 1 soluble similar a fms (Flt-1)	Suero materno	10.2	98.5	Sovio y cols., 2017

Aunque los marcadores bioquímicos han demostrado ser eficaces en alguna medida, su rendimiento es clínicamente limitado y actualmente su uso se restringe a ensayos de carácter experimental. Además, los bajos VPP y altos VPN que presentan este tipo de pruebas, solo indican que la mujer no se encuentra en un proceso real de trabajo de parto, pero no pueden predecir de forma temprana a las mujeres con APP. Por lo tanto, es necesario contar con una herramienta clínica útil que pueda distinguir de forma temprana a las mujeres embarazadas con riesgo de desarrollar esta patología.

En los últimos años se han logrado grandes avances en los métodos diagnósticos para identificar a mujeres con APP. No obstante, a pesar de estos esfuerzos, no se ha podido reducir la prevalencia y las complicaciones perinatales potenciales resultados de la prematuridad, por lo tanto, cabe la necesidad de contar con un

método objetivo y no invasivo que permita la detección precoz de las pacientes con alto riesgo.

## **2. Antecedentes**

La agregación familiar del NPT, la aparición recurrente en las mujeres y la disparidad en poblaciones racializadas (o disparidad social) ha planteado la hipótesis de la existencia de una predisposición genética a esta patología. En México se han realizado pocos estudios que exploren los SNPs en genes involucrados con la respuesta inflamatoria y su asociación con el NPT, así como genes implicados con otras complicaciones del embarazo que pueden estar involucrados en alguna ruta biológica que conduzca a este desenlace.

Existen reportes acerca de la identificación mediante PCR del SNP “rs1800629” (G>A) del gen TNF- $\alpha$  (Valdez y cols., 2004), en mujeres mestizas con genotipo homocigoto (AA) y heterocigoto (GA) para el alelo de riesgo, las cuales no mostraron diferencias significativas en la frecuencia genotípica y alélica al comparar casos y controles. Mientras que el SNP “rs12109” (G>A) del gen de renina (REN) reportado en mujeres mestizas, ha mostrado una diferencia significativa en el grupo de mujeres con NPT para el alelo de riesgo y una mayor frecuencia en el genotipo homocigoto (AA) y heterocigoto (GA) en el grupo con este desenlace (Rodríguez-Sánchez y cols., 2019). Otro estudio publicado por Ávila y cols. (2018), reportaron una mayor frecuencia del alelo 2 de IL-1RN (repetición en tándem de 86 pb) en mujeres del norte de México con aborto espontáneo recurrente.

Si bien los marcadores inflamatorios tienen una gran relevancia en la patogénesis del NPT, la heterogeneidad que presenta en su etiología ha llevado a la búsqueda de otros genes implicados en la actividad contráctil del útero, como lo es el receptor de progesterona (RPG), en el cual se ha encontrado un SNP en la posición +331 (G>A) de este gen (Díaz-Cueto y cols., 2008) y el SNP sin sentido “rs6166” (C>T) en el gen receptor de la hormona folículo estimulante (RFSH) en muestras de tejido placentario (Dominguez-Lopez y cols., 2018). Para el primer SNP, no se

encontraron diferencias significativas en la frecuencia genotípica y alélica en mujeres provenientes de la Ciudad de México. Sin embargo, para el segundo SNP en esta misma población, el genotipo homocigoto (TT) y heterocigoto (CT) mostró un riesgo significativamente mayor de NPT en comparación con los individuos portadores del genotipo CC. Por lo tanto, la desregulación de estos receptores podría explicar la activación temprana del trabajo de parto.

El estudio de SNPs puede ser útil para predecir de forma temprana el riesgo de que una mujer culmine en un NPT, incluso antes del embarazo. Por lo tanto, la utilización de SNPs puede ser un enfoque indirecto que permite estudiar la variación genética dentro de una región genómica de interés con el fin de detectar asociaciones con la enfermedad.

### **3. Planteamiento del problema**

- A nivel mundial no se cuenta con herramientas de detección temprana para prevenir el NPT. La exploración digital y el uso de biomarcadores como la cuantificación de fibronectina fetal, no ha disminuido el riesgo de NPT, por lo tanto, es necesario contar con nuevas herramientas pronósticas que faciliten la detección de mujeres con susceptibilidad a desarrollar esta patología. La identificación de un conjunto de SNPs genéticos relacionados con la respuesta inflamatoria supone una nueva alternativa para identificar factores de riesgo relacionados con el NPT.

### **4. Hipótesis**

- Si es posible identificar un conjunto de SNPs de genes relacionados con la respuesta inflamatoria que resulten asociados al desarrollo del NPT en población mexicana, podremos sugerir un grupo común de genes, que pueden predecir el desenlace de NPT.

## **5. Objetivo general**

- Identificar SNPs de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, que confieren riesgo aumentado para el desarrollo del NPT.

## **6. Objetivos específicos**

1. Obtener información clínica, demográfica y de las variables socioeconómicas de mujeres con desenlace de NPT espontáneo y mujeres con desenlace de NT.
2. Diseñar y utilizar un panel de SNPs de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, para identificar SNPs asociados al NPT.

## 7. Metodología

### 7.1 Muestras biológicas

Se colectaron un total de 210 muestras de saliva, de las cuales 57 correspondieron a mujeres con desenlace de NPT y 153 con desenlace de NT. La colecta se llevó a cabo en el Hospital Materno Infantil de Inguarán y en la asociación de padres y madres de familia con bebés prematuros “Con Amor Vencerás”, ubicados en las alcaldías Venustiano Carranza y Miguel Hidalgo respectivamente, en la Ciudad de México.

Para evitar estratificación de la población, la ascendencia mexicana fue identificada por autoinforme, a partir de un cuestionario que rastrea el origen étnico de tres generaciones desde cada paciente. Se recopiló información demográfica, antropométrica y clínica de las mujeres participantes, a partir de un cuestionario clínico. Posteriormente toda la información obtenida fue vaciada en una base de datos electrónica para su análisis.

A cada mujer se le solicitó firmar una carta de consentimiento informado (la cual una vez firmada se procedió a la toma de muestra) aprobada en el proyecto No. “FM/DI/064/2019” registrado en la Facultad de Medicina, UNAM, y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con el número de registro “PAPIIT IN210420”

Se informó a los pacientes, el nombre y objetivo del proyecto de estudio, la confidencialidad de los datos recabados y la utilización del material biológico, conforme a lo estipulado por la declaración de Helsinki y la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA). *Ver consentimiento informado en la Bibliografía I.*

La toma del material biológico se llevó a cabo con un dispositivo en el que se depositaron 5 ml de saliva. (DNA genotek, Oragene “DNA OG-500”, Ontario, Canadá).

## **Población de estudio**

- Universo: Mujeres que acudieron para atención de su embarazo a los hospitales de la Ciudad de México.
- Población de estudio: Mujeres cuyo desenlace de gestación haya resultado en un NPT o NT.

## **Criterios de inclusión y exclusión**

### **Inclusión:**

- Mujeres que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado.
- Mujeres de 18 a 36 años.
- Mujeres que cursaron su embarazo con desenlace pretérmino y mujeres con embarazo normo-evolutivo.
- Mujeres autoidentificadas como mexicanas.

### **Exclusión:**

- Mujeres que hayan cursado su embarazo con: gestación gemelar, preeclampsia, eclampsia, sangrado vaginal, anomalías anatómicas uterinas, trombofilias, incompetencia cervicovaginal, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), enfermedades autoinmunes, diabetes gestacional, cáncer, polihidramnios, tabaquismo, alcoholismo y toxicomanías, individuos que tenían más de un grupo étnico en su ascendencia.

## **Cálculo de tamaño de muestra**

Se calculó el mínimo tamaño de muestra utilizando el diseño metodológico sugerido por Pértegas y Pita (2002), el cual está enfocado en un diseño de casos y controles, bajo el supuesto de detectar Odds Ratio (OR)  $\geq 2$ . Se empleó un modelo genético basado en la frecuencia del alelo menos común en casos y controles, a partir del SNP sin sentido "rs1182992805" del gen que codifica la subunidad beta-3 de la proteína de unión a nucleótidos de guanina (*GNB3*), el cual presentó una prevalencia en el grupo de neonatos nacidos de mujeres de ascendencia afroamericana con RPM, de acuerdo con el estudio publicado por Modi y cols. (2018).

El cálculo estimado acorde a un muestreo no probabilístico fue de 66 casos y 66 controles, suficientes para detectar un OR  $\geq 2$  con un nivel de significancia del 95% y poder de 80%, asumiendo un tamaño muestral de un caso por cada control (1:1). Sin embargo, el número total de muestras colectadas fue de 210, lo que supera el mínimo tamaño muestral, resultando en una relación final de un caso por cada tres controles (1:3).

## **7.2 Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos**

La remoción y purificación del ácido nucleico se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo de extracción de DNA (DNA genotek, Ontario, Canadá), que ofrece un rendimiento de 110  $\mu\text{g}$  de DNA total (DNA genotek, 2018).

Brevemente, el tubo con saliva se mezcló por inversión durante unos segundos para garantizar la homogeneidad de la muestra y se incubó en baño María (Aquabath, 18902A) a 50°C por una 1 hora para garantizar que las nucleasas se inactivaran y no degradaran el material genético. Pasado el tiempo de incubación, se transfirió 1 ml de saliva en tubos de reacción para microcentrífuga de 1.5 ml con tapa (Eppendorf, Safe-Lock tubes 1.5 ml, Alemania) y se adicionó 40  $\mu\text{l}$  del reactivo de

lisis (Purifier prepITL2P) a cada alícuota, para precipitar las impurezas y los inhibidores.

Cada alícuota se mezcló utilizando vortex (Barnstead, MaxiMix II) por unos segundos y se almacenó en hielo por 10 minutos para eliminar las impurezas. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se trasladaron a una microcentrífuga de escritorio (Sorvall, Pico) a 3,500 rpm por 10 minutos para facilitar el precipitado y depósito de las impurezas. Después se trasladó el sobrenadante de cada alícuota a un tubo Falcon (Corning, USA) con una micropipeta, prestando atención en no tocar el precipitado que contenía los contaminantes.

Se procedió a deshidratar el DNA, añadiendo etanol al 95% a un tubo Falcon en una relación v/v, mezclando suavemente por inversión 15 veces hasta observar un precipitado en forma de fibras blanquecinas, las cuales variaban en tamaño dependiendo la cantidad de DNA por muestra. Se dejó incubar el tubo a temperatura ambiente por 10 minutos, se mezcló por inversión 10 veces para distribuir su contenido en alícuotas de 1.5 ml, las cuales fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 5 minutos, para liberar el DNA del etanol. Posteriormente, cada tubo se retiró cuidadosamente de la microcentrífuga para no mezclar el DNA precipitado con el sobrenadante que contenía el etanol, el cual finalmente se desechó.

Para rehidratar el DNA, se adicionaron 30  $\mu$ l de agua calidad biología molecular libre de nucleasas a cada alícuota, se mezcló e incubó por 10 minutos a 50°C en una incubadora (Eppendorf, ThermoStat plus, Alemania).

La concentración y pureza del DNA (relación 260/280; 260/230) se evaluó mediante espectrofotometría, utilizando el sistema Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, USA). Se verificó que todas las muestras contaran con una concentración mínima de 225 ng/ $\mu$ l de DNA y una relación 260/280 y 260/230 igual o superior a 1.8 y 1.5 respectivamente, para cumplir con los requerimientos de calidad especificados por la Unidad de Genotipificación y Análisis de expresión del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

## **Integridad del DNA**

Para determinar la integridad del DNA, se utilizó la técnica de electroforesis a partir del corrimiento de geles de agarosa al 2% p/v, teñidos con tinte intercalante (GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10,000X en DMSO).

Para la preparación del gel se mezclaron: 0.6 g de agarosa en 30 ml de buffer TAE al 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La mezcla se agitó suavemente y se calentó en un microondas en intervalos de 5 segundos hasta obtener un aspecto translúcido, que indicaba la completa disolución de la agarosa. Después se adicionaron 3  $\mu$ l del tinte intercalante “GelRed” al matraz con agarosa y se vertió a un portageles, en el cual se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente para solidificar el gel. Pasado ese tiempo, el gel se trasladó a una cámara de electroforesis donde se adicionó buffer TAE 1X y se procedió a cargar las muestras de DNA a cada pozo del gel.

Previamente a cada muestra de DNA se le adicionó buffer de carga en una relación v/v (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X), para facilitar el depósito del material genético dentro de cada pozo y seguir su avance a través del gel. También se utilizó un marcador de peso molecular de 100 – 2000 pb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA.

Para la corrida del gel de agarosa se utilizó una carga eléctrica de 60 voltios por 1 hora, para separar las moléculas de DNA con respecto a su tamaño. La observación de dichos fragmentos se llevó a cabo con el uso de un foto-documentador (ChemiDoc XRS+ System), en el cual se validó que los fragmentos tuvieran un tamaño  $\geq$  2.5 kpb, para cumplir con los requisitos del proceso de secuenciación. Una vez verificada la integridad del material genético, todas las alícuotas seleccionadas fueron almacenadas en un ultracongelador (Eppendorf, Innova U535, Alemania). Posteriormente, fueron llevadas a la Unidad de Alta Tecnología (UAT) del INMEGEN para validar la concentración, pureza e integridad de las muestras, a partir del método de cuantificación por fluorometría, usando la plataforma “Qubit

dsDNA BR Assay” y la técnica de electroforesis automatizada por chip “TapeStation”.

### **7.3 Diseño de genes candidatos y sondas de captura**

Los genes candidatos se seleccionaron en función de la plausibilidad biológica con el nacimiento prematuro. Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los genes reportados en asociación con este desenlace y se revisaron resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo del que formo parte. Se eligieron 42 genes asociados con la regulación de la respuesta inflamatoria y el NPT (Strauss y cols., 2018; Ribeiro de Andrade Ramos y da Silva, 2018; Pandey y cols., 2017; Ávila y cols.,2018).

Se realizó un diseño de sondas de hibridación personalizado, a partir de la aplicación web “SureDesign” (Agilent Technologies, USA), que estuvo basado en el genoma humano de referencia, en su versión GRCh37 (denominado también como hg19). El diseño cubrió todos los intrones, exones codificantes y 10 bases flanqueantes en los extremos 3' y 5' de los genes seleccionados. El tamaño de la región de captura incluía un total 408 kpb, distribuidos en 19,755 sondas de DNA, con una región secuenciable de 150 pb cada una. La profundidad de cobertura promedio utilizada fue de 200X, suficiente para cubrir el 90% de las regiones objetivo con 20 lecturas o más.

En este estudio el panel de genes no contempló SNPs dirigidos y asociados previamente con el NPT. El descubrimiento de los SNP dentro de los genes se realizó mediante secuenciación de DNA y con el software de genotipificación SureCall (Versión 4.2.1, Agilent Technologies), el cual utiliza los repositorios de: dbSNP (NCBI), COSMIC ID, gnomAD y 1000 genomas.

## 7.4 Secuenciación y genotipificación

### Haloplex - enriquecimiento de objetivos.

La captura y aislamiento de las regiones objetivo del DNA genómico (DNAg) se realizó con el kit “HaloPlex Custom Thier 1” (Agilent Technologies, California, USA), el cual utilizó el diseño personalizado de sondas de hibridación (Tabla 2).

La construcción de la biblioteca de DNA, el enriquecimiento de objetivos, la captura de sondas híbridas enriquecidas y la amplificación de los fragmentos, se llevó a cabo siguiendo la versión “G0” del protocolo de enriquecimiento de objetivo de “HaloPlex” (Writte y cols., 2019; Agilent, 2018) , el cual puede consultarse en la *Bibliografía II*.

### Secuenciación por síntesis

El proceso de secuenciación se llevó a cabo utilizando la plataforma “Miseq” de Illumina (San Diego, CA, USA), que emplea la tecnología de secuenciación por química de síntesis (SBS) de extremos emparejados, que consiste en la lectura de ambas hebras de las moléculas de DNA. Se usó el kit de reactivos “Miseq v2 (300)”, que incorporaba un total de 300 ciclos (150 ciclos por cada lectura emparejada y 12 ciclos para la secuencia del código de barras), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina, 2022).

El flujo de trabajo de Illumina consiste en la carga de los fragmentos genómicos enriquecidos, a una celda de flujo que está recubierta con oligonucleótidos complementarios a las secuencias de DNA de cada muestra. El DNA es inmovilizado, desnaturalizado y amplificado por el método de amplificación clonal en puente, para generar millones de clúster clonales en una sola ejecución de secuenciación. Cada molécula de DNA es secuenciada a partir de la polimerización y excitación de dNTPs marcados con fluoróforos, y a partir de las mediciones de intensidad de señal lumínica durante cada ciclo de secuenciación. Los resultados

del proceso de secuenciación consistieron en archivos de texto plano en formato “FASTQ”, que almacenaron la secuencia biológica de cada muestra. La importancia de dichos archivos radicó en que son la entrada principal para el análisis secundario de las secuencias de DNA, que incluyó el proceso de alineación con el genoma de referencia para realizar el llamado de variantes (Illumina, 2017).

## **Genotipificación**

Para llevar a cabo la genotipificación de las secuencias, se empleó el Software “SureCall” (Versión 4.2.1, Agilent Technologies) que combina algoritmos de código abierto para el análisis de datos de secuenciación de próxima generación de extremos emparejados.

Los 210 archivos en formato “FASTQ” generados previamente por la plataforma “MiSeq”, fueron cargados en el programa “SureCall”, el cual eliminó secuencias adaptadoras usadas durante la secuenciación por síntesis y alineó cada lectura con el genoma humano de referencia “GRCh37” utilizando el alineador de código abierto “Burrows-Wheeler” (Agilent, 2020). El llamado de variantes se ejecutó con el algoritmo patentado de Agilent “SNPPET” ya que resultó un método con alta sensibilidad y especificidad para detectar polimorfismos con baja frecuencia (Mansukhani y cols., 2018).

Finalmente, la descripción de SNPs para cada muestra fue almacenada en archivos con extensión “VCF” (Variant Call Format), de acuerdo con la información contenida en las bases de datos de NCBI, ClinVar, OMIM y 1000 genomas. Los archivos con extensión “VCF”, se convirtieron a formato con extensión “xls” (Excel, Office 2019) para facilitar el análisis de las secuencias. En la Tabla 2 se muestra un ejemplo de la descripción del SNP rs1968441 (CARD 8) con el resumen de sus características.

**Tabla 2.** Características del SNP.

<i>Gen</i>	<i>ID</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Posición</i>	<i>Alelo mayor</i>	<i>Alelo menor</i>	<i>Ubicación</i>
CARD 8	rs1968441	19	48711789	T	G	Exón

## 7.5 Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico de las características descriptivas de los grupos de estudio, se utilizó el software de código abierto “RStudio 4.1.1” (Rstudio, PCB, USA). Primero se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y posteriormente se utilizó la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney para calcular la significancia estadística en aquellas variables que se desviaron de la normalidad, mientras que la prueba t-student fue utilizada para evaluar aquellas variables que siguieron una distribución normal.

Todos los archivos resultantes del llamado de variantes fueron divididos en casos y controles. Las desviaciones en el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se determinaron en el grupo control mediante la prueba de independencia Chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), utilizando el software SNPStats (SNPSstats, Cataluña, ESP). Todos los SNPs que se desviaron del EHW fueron eliminados de nuestro análisis.

Como parte de un análisis inicial, se identificó el número total de SNPs únicos y compartidos de cada grupo de estudio, valiéndonos del uso de un diagrama de Venn (Jvonn, GenoToul Bioinfo y Sigenae, Francia) (Fig. 3). Posterior a ello, se realizó un filtrado de SNPs que se presentaban únicamente en las mujeres con desenlace de NPT, con ayuda del programa Rstudio, el cual generó una lista de los SNPs con su identificador único, su distribución a nivel de gen, y la ubicación que tiene en el genoma (Tabla 5).

Para evaluar la asociación entre cada SNP con el desenlace de NPT, se realizó una segunda fase de análisis, que consistió en evaluar la frecuencia genotípica y alélica del alelo de menor, el cual fue designado como el alelo de riesgo. Se consideró el “modelo de herencia dominante” (Aa+aa) y su distribución en casos y controles se contrastó con el grupo de referencia (homocigotos para el alelo común). Posterior a ello, se realizó un análisis de asociación de alelos (Frecuencia alélica). Las diferencias en la distribución de los genotipos y la frecuencia alélica entre los dos grupos de estudio, se analizó con el software Rstudio y con la prueba de  $\chi^2$  de Pearson, utilizando un valor de  $p < 0.05$  como criterio de significancia estadística. También se cuantificó la probabilidad de riesgo a partir de la prueba estándar de OR, con sus respectivos intervalos de confianza (IC).

## **8. Resultados**

### **8.1 Grupos de estudio**

Se colectaron un total de 210 muestras, de las cuales 57 fueron provenientes de mujeres con desenlace de NPT y 153 de NT. La Tabla 3 muestra las características descriptivas de las mujeres que participaron en el estudio. La edad materna, el peso pregestacional y el IMC no mostraron diferencia significativa, la cual fue notable para las SDG en que ocurrió el desenlace.

**Tabla 3.** Características de las mujeres que conforman los grupos de estudio.

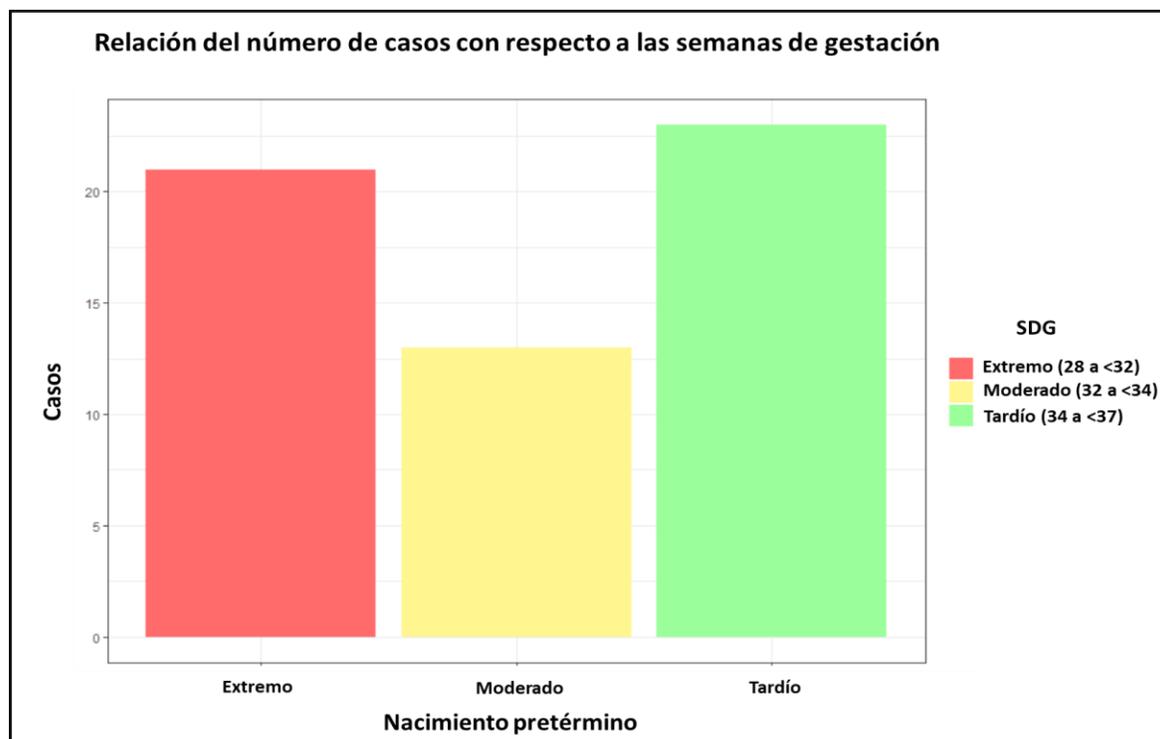
Característica	Pretérmino n=57	Término n=153	p-value
Edad materna (promedio±DS)	24.9 ± 5.8	25.2 ± 6.3	0.751
Talla (cm)	152 ± 8.5	155 ± 5.4	<0.05*
Peso pregestacional (kg)	60.2 ± 12	63.6 ± 12.9	0.266
IMC	25.1 ± 4.6	26.1 ± 5.3	0.168
SDG	31.7 ± 5.1	38.9 ± 1.1	p<0.001*

IMC: Índice de masa corporal.

SDG: Semanas de gestación.

(\*): Significancia estadística.

La distribución de mujeres con desenlace de NPT en función de la edad gestacional (Fig. 2), muestra que el grupo NPT tardío, es el que presentó mayor número de casos (23), seguido del grupo NPT extremo (21) y por último NPT moderado (13).



**Figura 2.** Frecuencia de mujeres con desenlace de NPT de acuerdo a la edad gestacional.

## 8.2 Banco de muestras

Se generó un banco de DNAg con las 210 muestras de ambos grupos que cumplieron las normas de calidad solicitadas por la UAT, INMEGEN.

## 8.3 Genes candidatos

Los genes candidatos seleccionados en el estudio (Tabla 4), codifican proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio que involucran diferentes mecanismos a nivel celular para modular la respuesta inmune.

**Tabla 4.** Genes candidatos asociados con el proceso inflamatorio y el NPT.

ATG16L1	CARD8	CD14	ICAM1	IFN- $\alpha$ 2	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
IL-1R1	IL-1RN	IL-4R	IL-6	IL-6R	IL-8	IL-10
IL-12B	IL-23 $\alpha$	NF-kB	NOD1	NOD2	PTPN2	TLR3
TLR4	TLR5	TLR9	TNF- $\alpha$	TNFSF-15	ADRA2C	CACNA1C
CNR1	CNR2	FGFR4	GNB3	HTR2A	MYO9 $\beta$	PTGER4
SLC22A4	SLC22A5	SLC51A	SLC6A2	SLC6A4	TPH1	TPH2

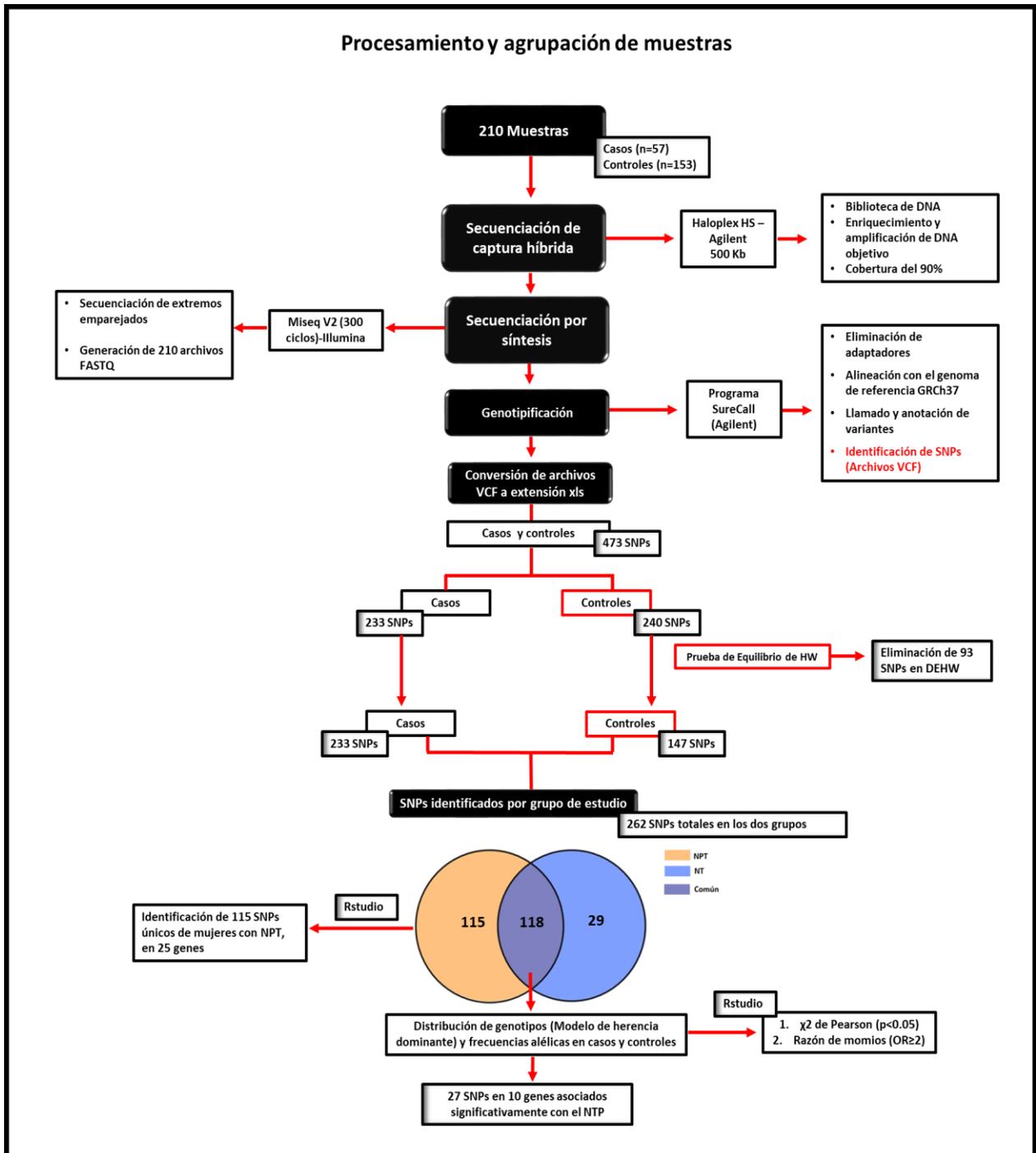
## 8.4 Total de SNPs identificados

Las muestras que conformaban el banco de DNAg fueron secuenciadas y genotificadas, obteniendo un total de 210 archivos con extensión "VCF".

Estos archivos incluían 473 SNPs totales para ambos grupos. 233 SNPs correspondieron al grupo de casos y 240 al grupo control (Fig. 3).

### **8.5 SNPs en equilibrio de Hardy-Weinberg**

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) realizado en los SNPs del grupo control, mostró que solo 147 SNPs se encontraban en equilibrio. Estos SNPs más los SNPs del grupo de casos, fueron agrupados y representados en el diagrama de Venn, mostrando su distribución en cada grupo de estudio (Fig. 3). Se observó que 115 SNPs pertenecían únicamente a las mujeres con desenlace de NPT, 29 correspondían al NT y 118 SNPs se compartían.



**Figura 3.** Diagrama de flujo que muestra la secuencia del trabajo realizado para la identificación y análisis de los polimorfismos desde la colecta de muestra.

## Primera fase de análisis

Los 115 SNPs localizados únicamente en el grupo de mujeres con desenlace de NPT, incluyeron 25 genes, 19 de ellos están implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria (*CARD8*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1R1*, *TLR3*, *TLR5*, *NOD1*, *PTPN2*, *IL-4R*, *IL-6R*, *NF- $\kappa$ B*, *ATG16L1*, *TLR4*, *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *IL-1RN*, *IL-8*, *IL-12B*, *IFN- $\alpha$ 2*, *TLR9*), 3 genes se relacionaron con el movimiento intracelular de calcio (*CACNA1C*, *HTR2A*, *PTGER4*), 2 genes con la hidroxilación del triptófano (*TPH1*, *TPH2*) y 1 gen con el transporte de serotonina (*SLC6A4*) (Tabla 5).

**Tabla 5.** SNPs presentes en mujeres con desenlace pretérmino.

Gen	SNP	Cromosoma	Posición	Alelo de riesgo	Ubicación	Frecuencia	
						HOM	HET
CARD8	rs1968441	19	48711789	G	Exón	25	0
	rs1968440	19	48711902	G	Exón	24	0
	rs4347733	19	48711960	T	Exón	1	2
	rs4423519	19	48711962	T	Exón	1	3
	rs4433919	19	48712031	G	Exón	8	0
	rs4802443	19	48712447	A	Exón	3	0
	rs1971785	19	48712614	C	Exón	24	0
	rs1971783	19	48712958	G	Exón	3	0
	rs1347170	19	48713950	C	Exón	3	2
	rs2008521	19	48715269	C	Intrón	24	0
	rs10500299	19	48722180	T	Exón	4	1
	rs4802448	19	48735287	G	Intrón	16	1
	rs4802449	19	48736706	A	Intrón	7	2
	rs10418189	19	48737028	T	Intrón	0	1

Continúa							
CACNA1C	rs772171893	12	2676794	G	Exón	0	1
	rs7138132	12	2722863	G	Intrón	25	0
	rs2238092	12	2723266	A	Intrón	16	2
	rs887334	12	2724022	G	Intrón	18	2
	rs2239124	12	2750893	T	Intrón	1	0
	rs216043	12	2760344	G	Intrón	25	0
	rs216045	12	2760708	A	Intrón	21	0
	rs56180838	12	2760898	T	Exón	0	1
	rs1051375	12	2788879	A	Exón	10	2
	rs10848683	12	2791130	T	Exón	16	2
	rs10774053	12	2791132	G	Exón	17	0
	rs10774054	12	2791205	G	Exón	26	0
	rs4765976	12	2806335	C	3'-UTR	23	2
SLC6A4	rs8066602	17	28523085	C	3'-UTR	13	3
	rs8066731	17	28523121	C	3'-UTR	15	2
	rs7224199	17	28523726	T	3'-UTR	14	1
	rs929881911	17	28524323	T	3'-UTR	1	0
	rs3813034	17	28524804	C	3'-UTR	13	3
	rs185569563	17	28524877	A	3'-UTR	1	0
	rs1042173	17	28525011	C	3'-UTR	6	0
	rs6354	17	28549898	T	5'-UTR	11	0
TNF- $\alpha$	rs10114470	9	117547772	C	3'-UTR	19	4
		9	117549607	C	3'-UTR	1	0
	rs999528554	9	117551599	G	3'-UTR	1	0
	rs10117785	9	117551603	A	3'-UTR	8	2
	rs3810936	9	117552885	C	Exón	18	1
	rs4246905	9	117553249	C	Intrón	20	0
	rs55717217	9	117554069	G	Intrón	3	7
	rs55785761	9	117554101	T	Intrón	3	1
IL1-R1	rs1019296	2	102721117	C	Intrón	11	4
	rs1800919	2	102759293	C	Intrón	7	0
	rs12613301	2	102759381	T	Intrón	13	3
	rs3771202	2	102772669	G	Intrón	24	0
	rs3917318	2	102792760	G	Intrón	10	0
	rs3917324	2	102793533	G	3'-UTR	0	2
	rs147187275	2	102794930	G	3'-UTR	3	0

Continúa							
	rs5743309	4	186990345	A	5'-UTR	1	0
	rs5743310	4	186990393	T	Exón	1	0
	rs35706535	4	187002911	C	Intrón	0	1
TLR3	rs3775292	4	187003025	G	Intrón	19	3
	rs2310393	4	187003177	G	Intrón	19	0
	rs1996594	4	187003339	A	Intrón	4	3
		4	187005222	A	Exón	1	0
	rs45508499	1	223282816	A	3'-UTR	1	0
	rs1861172	1	223283234	C	3'-UTR	2	0
TLR5	rs1053954	1	223283851	C	Exón	1	0
	rs7512943	1	223283910	G	Exón	26	0
	rs5744174	1	223284528	G	Exón	1	1
	rs5744168	1	223285200	A	Exón	0	1
	rs5743373	7	30464961	C	3'-UTR	1	0
	rs5743372	7	30465035	A	3'-UTR	2	0
NOD1	rs5743369	7	30468184	C	Intrón	1	1
	rs5743368	7	30468216	T	Intrón	1	1
	rs5743357	7	30485971	A	Intrón	0	1
	rs1558067	7	30503280	C	Intrón	12	1
	rs2542156	18	12785557	T	3'-UTR	25	0
	rs2847296	18	12786217	G	Intrón	25	0
PTPN2	rs2542157	18	12787247	G	Intrón	11	4
	rs912018911	18	12787577	T	Intrón	1	0
	rs45456495	18	12792228	T	Intrón	10	2
	rs2032174	18	12792954	A	Intrón	0	1
	rs8052962	16	27326842	G	Intrón	7	0
	rs3024636	16	27366982	C	Intrón	0	1
IL-4R	rs3024680	16	27375159	C	3'-UTR	0	1
	rs1049631	16	27375542	A	3'-UTR	5	1
	rs8832	16	27375787	G	3'-UTR	8	1
	rs2229238	1	154437896	C	3'-UTR	16	1
	rs7514452	1	154438084	T	3'-UTR	16	0
IL-6R	rs4072391	1	154438880	C	3'-UTR	16	0
	rs187407525	1	154439008	T	3'-UTR	1	0
	rs4379670	1	154439865	A	3'-UTR	17	1

Continúa							
TPH2	rs7299582	12	72356314	A	Intrón	22	1
	rs7299528	12	72356485	T	Intrón	16	2
	rs10879347	12	72358770	C	Intrón	1	1
	rs7298203	12	72359047	G	Intrón	23	0
	rs10784943	12	72359243	G	Intrón	15	4
HTR2A	rs7324017	13	47406845	T	3'-UTR	1	3
	rs7324218	13	47406956	T	3'-UTR	0	1
	rs6310	13	47470352	T	Intrón	23	0
	rs6312	13	47470824	T	Exón	23	0
NF-κB	rs72696119	4	103422504	G	5'-UTR	9	3
	rs2272676	4	103423326	T	Intrón	7	0
	rs1020760	4	103514445	G	Intrón	9	2
	rs1609993	4	103514658	C	Exón	24	1
ATG16L1	rs2289472	2	234182240	T	Intrón	2	0
	rs72976353	2	234203543	C	3'-UTR	1	0
	rs11682236	2	234203740	G	3'-UTR	1	0
	rs10803619	2	234203876	T	3'-UTR	1	0
TLR4	rs2770148	9	120471058	A	Intrón	25	0
	rs5030721	9	120476365	A	Exón	0	1
	rs11536887	9	120477674	G	3'-UTR	0	1
IL-6	rs1474347	7	22768124	A	Intrón	20	2
	rs185681377	7	22769575	A	Intrón	0	1
IL-1β	rs3917359	2	113591162	A	Intrón	1	0
IL-1RN	rs4252041	2	113890610	T	3'-UTR	1	0
IL-8	rs1126647	4	74609045	T	3'-UTR	5	4
IL-12B	rs1368439	5	158742014	T	3'-UTR	24	0
IFNα2	rs146075528	9	21384405	C	3'-UTR	1	0
TLR9		3	52258317	T	Exón	1	0
PTGER4	rs530042397	5	40680168	A	5'-UTR	0	1
TPH1	rs56151798	11	18044410	G	Exón	0	1

Se enlistan los genes de acuerdo con el número de SNPs ubicados en ellos. Las cajas rojas ubicadas en la segunda columna representan SNPs que no tienen rs. La frecuencia situada en la séptima columna, indica el número total de mujeres con genotipo homocigoto y heterocigoto para cada SNP descrito.

## Representación gráfica de los SNPs en cada uno de los genes

La gran mayoría de los genes reportados en la Tabla 5, codifican proteínas que participan en el proceso inflamatorio, las cuales son clasificadas en cuatro categorías de acuerdo con su ubicación celular: i) proteínas de membrana celular, ii) proteínas citoplasmáticas, iii) proteínas extracelulares y iv) proteína nuclear.

i) En los genes que codifican proteínas de membrana celular se identificaron 26 SNPs, los cuales se citan a continuación:

Siete SNPs se encontraron en el gen de IL-1R1, de los cuales, cinco se ubican en regiones intrónicas: rs1019296 (T>C), rs1800919 (A>C), rs12613301 (A>T), rs3771202 (C>G) y rs3917318 (A>G). Los tres primeros entre el exón 1-2, el cuarto entre el exón 2-3 y el quinto entre el exón 11-12. Los dos SNPs restantes: rs3917324 (C>G) y rs147187275 (C>G) se encontraron en la región 3'-UTR (Fig. 4).

Cinco SNPs se localizaron en el gen IL-4R en regiones no codificantes: El primero con rs8052962 (T>G) en un intrón entre el exón 1-2. El segundo rs3024636 (T>C) localizado en un intrón entre el exón 7-8, y los tres últimos con rs3024680 (T>C), rs1049631 (G>A) y rs8832 (A>G), en la región 3'-UTR (Fig. 4).

Cinco SNPs se ubicaron en IL-6R, todos ellos en la región 3'-UTR: rs2229238 (T>C), rs7514452 (C>T), rs4072391 (T>C), rs187407525 (C>T) y rs4379670 (T>A).

Tres SNPs se encontraron en TLR4: rs5030721 (G>A), rs2770148 (G>A) y rs11536887. El primero en el exón 2, el segundo en un intrón ubicado entre el exón 3-4 y el tercero en la región 3'-UTR.

Seis SNPs se ubicaron en el gen TLR5. Cuatro de ellos rs1053954 (T>C), rs7512943 (A>G), rs5744174 (A>G) y rs5744168 (G>A) se localizaron en el exón 6 y los dos restantes (rs45508499 (G>A) y rs1861172 (T>C)) en la zona 3'-UTR (Fig. 4).

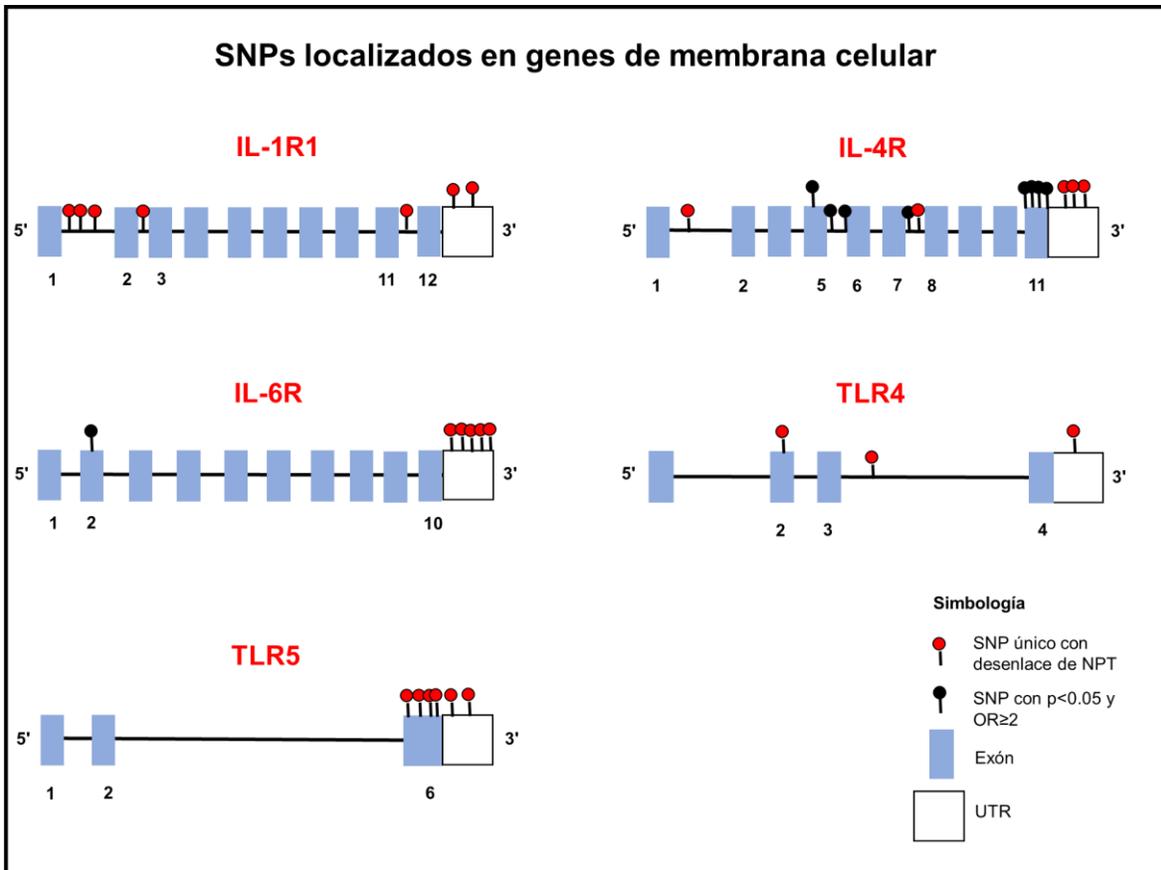


Figura 4. Esquema de la distribución de SNPs asociados al NPT.

ii) En los genes que codifican proteínas citoplasmáticas se identificaron 38 SNPs:

Siete de ellos pertenecen a TLR3. El primero con rs5743309 (C>A) está en la región 5'-UTR. El segundo con rs5743310 (A>T) en el exón 1. Los cuatro siguientes con rs35706535 (T>C), rs3775292 (C>G), rs2310393 (A>G) y rs1996594 (G>A) en un intrón entre el exón 3-4. El último SNP se encuentra en el exón 4 en la posición 2,482 de este mismo gen (Fig. 5).

Un SNP se encontró en el exón 2 de TLR9, que corresponde a la posición 131 de este gen y del cual no se tiene registro.

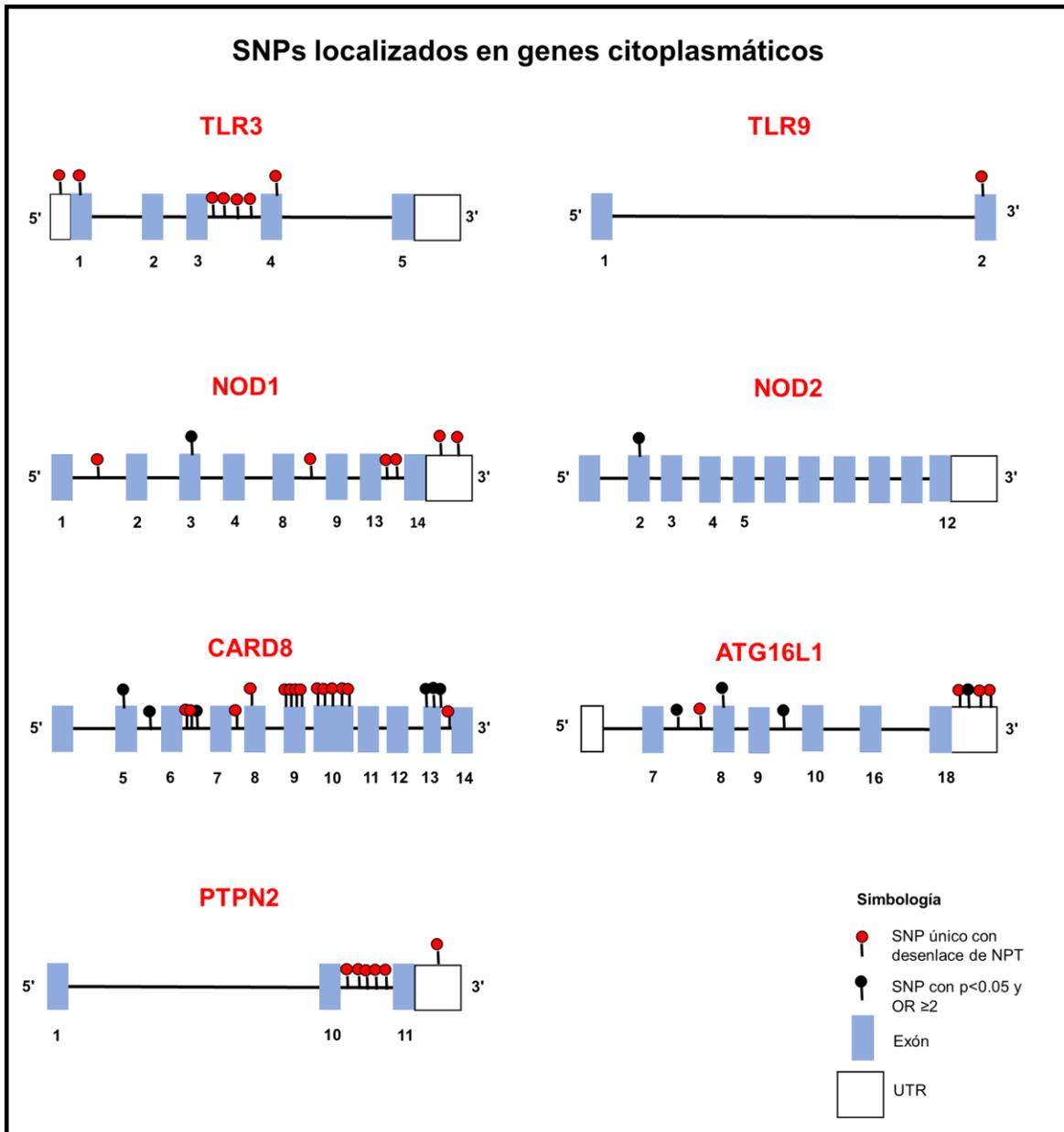
Seis SNPs se identificaron en el gen NOD1. Los cuatro primeros con rs1558067 (T>C), rs5743357 (G>A), rs5743369 (T>C) y rs5743368 (C>T), se localizaron en regiones intrónicas. El primero entre el exón 1-2, el segundo entre el exón 8-9, y los

dos siguientes entre el exón 13-14. Los dos últimos SNPs se encontraron en la región 3'-UTR, con rs5743373 (T>C) y rs5743372 (G>A) (Fig. 5).

Catorce SNPs fueron localizados en CARD8. Los dos primeros con rs4802449 (G>A) y rs10418189 (C>T) se encontraron en un intrón entre el exón 6-7. El tercero con rs4802448 (A>G) en un intrón entre el exón 7-8. El cuarto SNP rs10500299 (C>T) en el exón 8. Los cuatro SNPs siguientes con rs1968441 (T>G), rs4347733 (C>T), rs4802443 (T>A) y rs1971785 (G>C), en el exón 9. Mientras que en el exón 10 se encontraron cinco SNPs con rs1968440 (A>G), rs4423519 (C>T), rs4433919 (A>G), rs1971783 (A>G) y rs1347170 (A>C). El último SNP en este gen con rs2008521 (T>C) se ubicó en un intrón entre el exón 13-14 (Fig. 5).

Cuatro SNPs se hallaron en ATG16L1. Uno de ellos (rs2289472 (C>T)) entre los exones 7-8. Los tres restantes (rs72976353 (T>C), rs11682236 (A>G) y rs10803619 (C>T)) están en la zona 3'-UTR.

Seis SNPs se descubrieron en PTPN2. Los cinco primeros se localizaron en un intrón entre el exón 10-11, con rs2847296 (C>G), rs2542157 (T>G), rs912018911 (C>T), rs45456495 (A>T) y rs2032174 (G>A). Mientras que en la región 3'-UTR se encontró el último SNP con rs2542156 (C>T).



**Figura 5.** Esquema de la distribución de SNPs asociados al NPT.

iii) En los genes que codifican proteínas extracelulares se identificaron 15 SNPs:

El primer SNP se identificó en el gen IFN- $\alpha$ 2 con rs146075528 (T>C), el cual se localizó en la región 3'-UTR (Fig. 6).

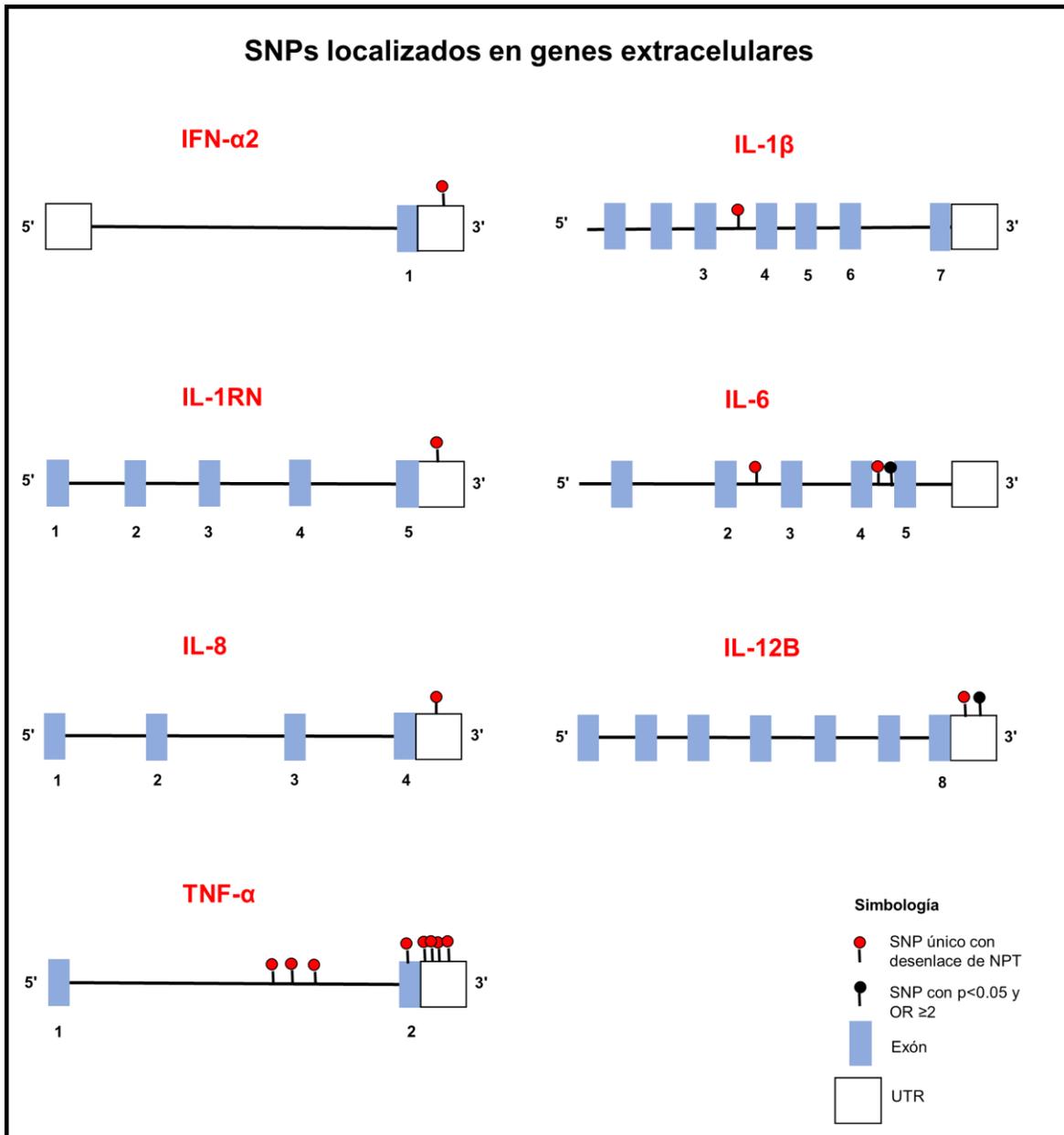
El segundo SNP con rs3917359 (G>A), se ubicó en una región intrónica entre el exón 3-4 del gen IL-1 $\beta$  (Fig. 6).

El tercer SNP con rs4252041 (C>T), se encontró en la región 3'-UTR de IL-1RN.

El cuarto y quinto SNP se localizaron en IL-6, con rs1474347 (C>A) y rs185681377 (G>A), situados en regiones intrónicas entre los exones 2-3 y los exones 4-5 respectivamente.

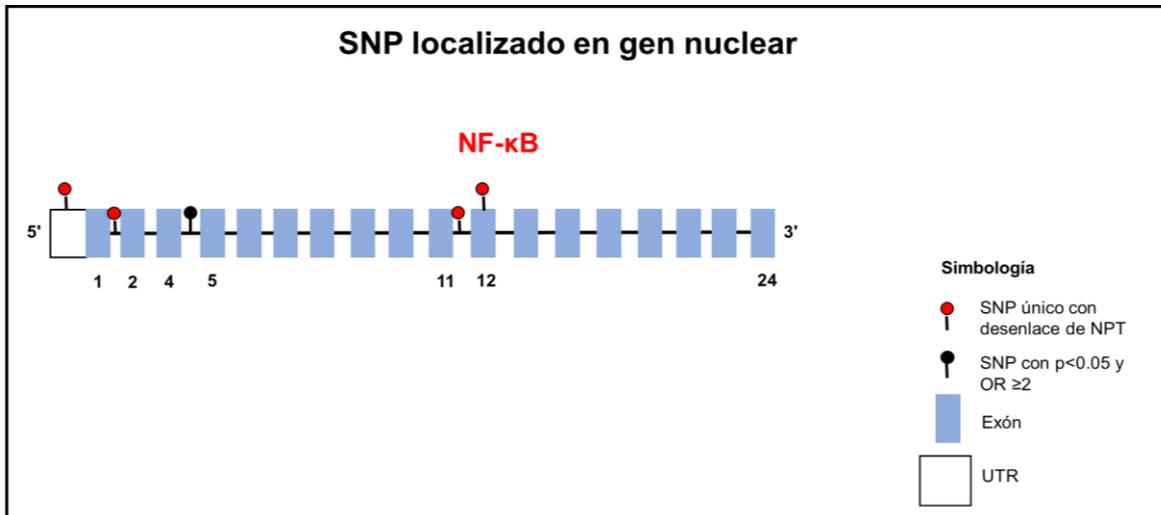
El sexto SNP se encontró en IL-8 (rs1126647 (A>T)), en la región 3'-UTR. Por otro lado, el séptimo SNP se localizó en IL-12B (rs1368439 (G>T)), en la región 3'-UTR.

Los ocho SNPs restantes se concentraron en TNF- $\alpha$ , de los cuales tres se localizaron entre los exones 1-2: rs4246905 (T>C), rs55717217 (A>G) y rs55785761 (C>T). Un SNP con rs3810936 (T>C) se encontró en el exón 2, y los cuatro restantes en la región 3'-UTR que corresponden al: rs10114470 (T>C), la posición 3,704 del gen, el rs999528554 (A>G) y rs10117785 (T>A). Figura 6.



**Figura 6.** Esquema de la distribución de SNPs asociados al NPT.

iv) Genes que codifican proteínas nucleares. El gen NF- $\kappa$ B presenta 4 SNPs. El primero rs72696119 (C>G) en la región 5'-UTR. Los dos siguientes: rs2272676 (G>T) y rs1020760 (C>G) en regiones intrónicas entre los exones 1-2, y 11-12 respectivamente. Mientras que el último SNP rs1609993 (T>C), se localiza en el exón 12 (Fig. 7).



**Figura 7.** Esquema de la distribución de SNPs asociados al NPT.

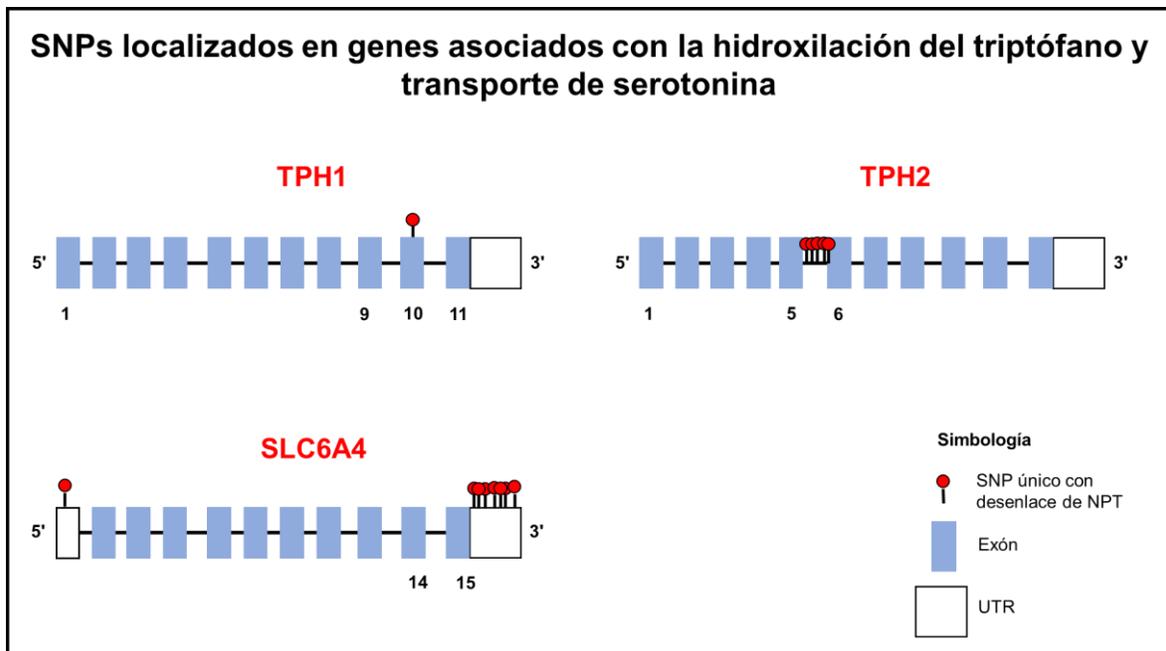
Para el grupo de genes implicados con la movilización de calcio intracelular, en esta primera fase de análisis fueron localizados 18 SNPs:

El primero con rs530042397 (C>A), se ubicó en la región 5'-UTR del gen PTGER4 (Fig. 8).

Cuatro SNPs más, se encontraron en el gen HTR2A, cuya proteína codificada se acopla a proteína Gq. Uno de ellos, rs6312 (C>T) está en el exón 1. Otro más, rs6310 (C>T) está en un intrón entre el exón 1-2. Los dos últimos corresponden al rs7324017 (C>T) y rs7324218 (C>T), y están en la región 3'-UTR (Fig. 8).

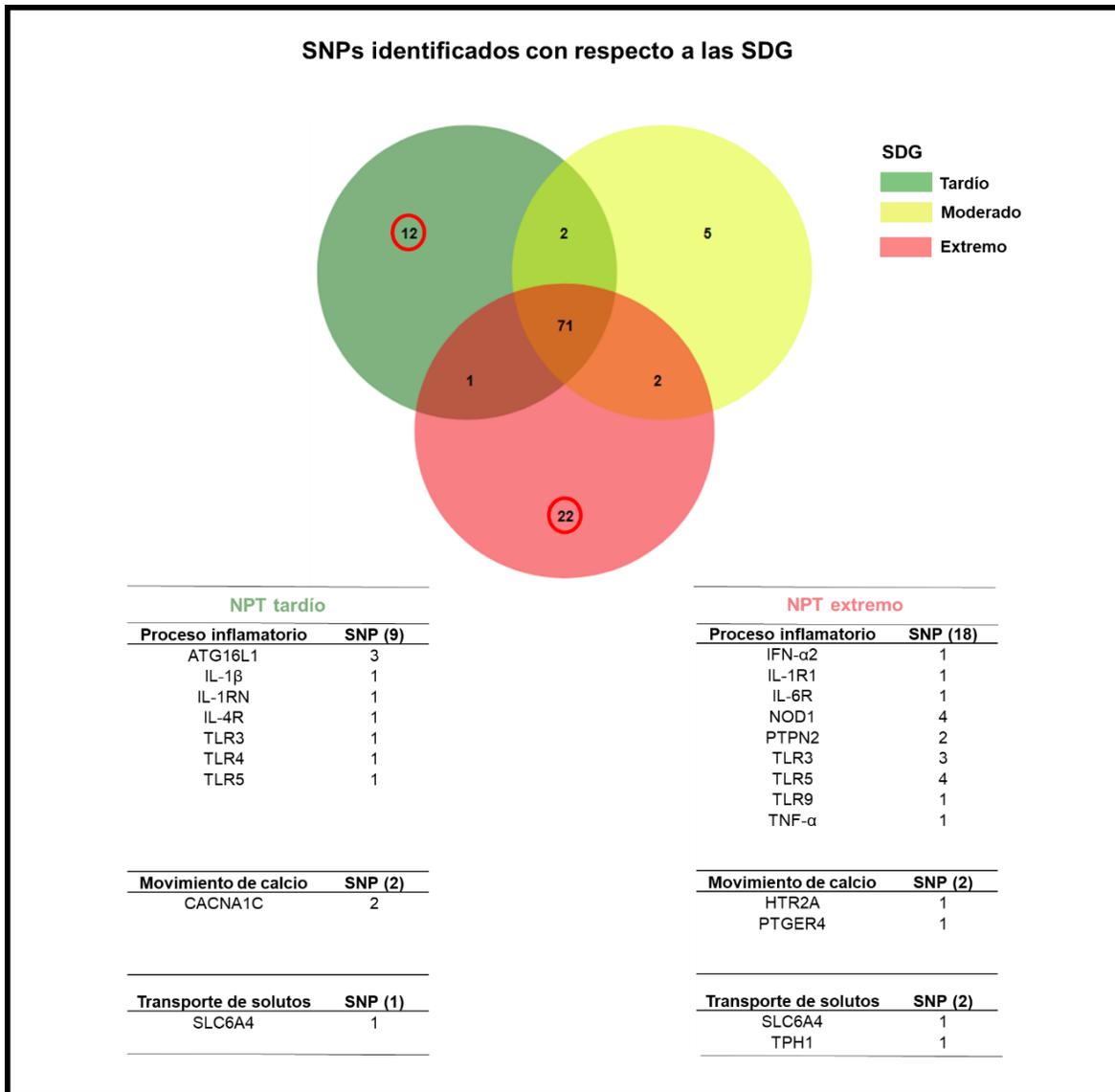
Trece SNPs se localizaron en CACNA1C. El primero con rs772171893 (A>G) en el exón 13. Los tres siguientes rs7138132 (C>G), rs2238092 (G>A) y rs887334 (T>G) en un intrón entre el exón 29-30. El quinto SNP rs2239124 (C>T) también está en un intrón, pero entre el exón 30-31. El sexto SNP rs56180838 (C>T) se encontró en el exón 31. Mientras que en un intrón localizado entre el exón 31-32, se encontró el séptimo y octavo SNP con rs216043 (A>G) y rs216045 (G>A). Cuatro SNPs más con rs1051375 (G>A), rs10848683 (C>T), rs10774053 (A>G) y rs10774054 (A>G) se ubicaron en exones, el primero en el exón 41 y los siguientes en el exón 43. El





**Figura 9.** Esquema de la distribución de SNPs asociados al NPT.

Los 115 SNPs cuya localización gráfica ha sido mostrada, correspondieron a 41 mujeres y fueron clasificados de acuerdo con la edad gestacional en que la mujer tuvo este desenlace. En la Figura 10, podemos observar 86 SNPs asociados con desenlace de NPT tardío; 80 con moderado y 96 en extremo. Sin embargo, la lista de genes destaca a aquellos que son propios de cada uno de los grupos.



**Figura 10.** Distribución de los SNPs localizados únicamente en mujeres con desenlace de NPT. Se muestra una lista con el número de SNPs propios de las mujeres con resolución de NPT tardío y extremo, así como los genes en los cuales fueron localizados.

## Segunda fase de análisis

Para determinar estadísticamente la contribución genética de los genotipos y el alelo menor de cada SNP con el desenlace de NPT, fueron utilizados los 118 SNPs compartidos en casos y controles (Fig. 3). Para ello, se comparó la frecuencia en la distribución de los genotipos a partir del modelo de herencia dominante, así como la frecuencia del alelo menor de cada SNP entre los dos grupos de estudio, a partir de la prueba de independencia “ $\chi^2$  de Pearson”, utilizando un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ). Además, se determinó la fuerza de asociación entre la presencia de cada SNP con el desenlace del NPT a partir de la prueba de OR (IC 95%), considerando como SNPs de riesgo, todos aquellos con valor de OR igual o mayor a 2.

El análisis basado en genotipos y frecuencia alélica para el alelo menor reveló que 27 SNPs distribuidos en 10 genes presentaron diferencia significativa entre casos y controles ( $p < 0.05$ ) y riesgo para el NPT ( $OR \geq 2$ ). 23 nuevos SNPs fueron localizados en diferente posición dentro de 8 genes que previamente se habían mencionado (*CARD8*, *IL-4R*, *ATG16L1*, *IL-12B*, *IL-6*, *IL-6R*, *NOD1*, *NF- $\kappa$ B*) y 1 SNP fue identificado en *NOD2*. El gen restante (*CACNA1C*), presentó 3 SNPs (Tabla 6).

En las Figuras 4-8 se muestran donde están ubicados cada uno de los nuevos SNPs en los genes ya reportados. Brevemente se cita la posición de cada uno de ellos en los genes que contienen las figuras.

i) Genes de proteínas de membrana celular.

Se localizaron 9 SNPs. Ocho de ellos en el gen de *IL-4R*: rs1805010 (A>G) en el exón 5. rs2074572 (C>T), rs2072130 (C>T) y rs3024622 (C>G) en regiones intrónicas. Los dos primeros entre el exón 5-6 y el último entre el exón 7-8. Los cuatro SNPs restantes con rs1805011 (A>T), rs2234900 (T>C), rs1805015 (T>C) y rs1805016 (T>G) en el exón 11 (Fig. 4).

Un SNP con rs2228144 (G>A), se localizó en el exón 2 del receptor de IL-6 (IL-6R) (Fig. 4).

**Tabla 6.** Frecuencia genotípica y del alelo menor de cada SNP, asociado con el NPT.

Gen	SNP (Alelos) <sup>1</sup>	Genotipo	Frecuencia (%)		P-value	OR <sup>2</sup>	IC <sup>3</sup>	Ubicación
		Alelo	NPT	NT				
CARD8	rs2288877 (T>C)	TT	74.51	99.88	0.02	2.57	2.28 - 2.85	Intrón
		TC+CC	25.49	0.12				
		T	76	89	0.002	2.5	2.31 - 2.70	
		C	24	11				
	rs17665482 (G>C)	GG	72.55	99.89	0.005	3.06	2.69 - 3.40	Intrón
		GC+CC	27.45	0.11				
		G	75	89	0.001	2.63	2.43 - 2.85	
		C	25	11				
	rs2288876 (A>G)	AA	70.59	99.88	0.004	3.13	2.75 - 3.48	Exón
		AG+GG	29.41	0.12				
		A	71	88	0.00004	3.14	2.89 - 3.41	
		G	29	12				
	rs8105324 (G>A)	GG	58.82	99.82	0.001	3.27	2.86 - 3.63	Exón
		GA+AA	41.18	0.18				
		G	60	84	0.000001	3.41	3.13 - 3.71	
		A	40	16				
	rs4802445 (T>C)	TT	54.9	99.82	0.0001	3.83	3.34 - 4.26	Exón
		TC+CC	45.1	0.18				
T		59	83	0.000001	3.37	3.09 - 3.67		
C		41	17					
rs3745718 (T>C)	TT	54.9	99.84	0.00003	4.25	3.70 - 4.74	Exón	
	TC+CC	45.1	0.16					
	T	58	84	0.0000001	3.9	3.57 - 4.26		
	C	42	16					
CACNA1C	rs216009 (T>C)	TT	82.35	99.97	0.0004	7.03	6.97 - 9.10	Intrón
		TC+CC	17.65	0.03				
		T	84	97	0.000002	7.05	6.43 - 7.76	
		C	16	3				
	rs7957163 (C>A)	CC	82.35	99.99	0.00003	14.22	14.07 - 18.55	3'-UTR
		CA+AA	17.65	0.01				
		C	85	99	0.0000002	11.55	10.51 - 12.76	
		A	15	1				

Continuación								
CACNA1C	rs1544514 (G>A)	GG	82.35	0.99	0.000004	28.57	28.27 - 37.45	Exón
		GA+AA	17.65	0.01				
		G	85	99	0.00000001	23.24	21.13 - 25.77	
		A	15	1				
IL-4R	rs3024622 (C>G)	CC	66.67	99.83	0.014	2.46	2.18 - 2.72	Intrón
		CG+GG	33.33	0.17				
		C	69	84	0.001	2.32	2.15 - 2.50	
		G	31	16				
	rs2074572 (C>T)	CC	80.39	99.91	0.04	2.53	2.24 - 2.80	Intrón
		CT+TT	19.61	0.09				
		C	80	92	0.002	2.65	2.45 - 2.87	
		T	20	8				
	rs1805010 (A>G)	AA	74.51	99.88	0.02	2.57	2.28 - 2.85	Exón
		AG+GG	25.49	0.12				
		A	75	89	0.001	2.54	2.34 - 2.75	
		G	25	11				
	rs2072130 (C>T)	CC	78.43	99.92	0.01	3.13	2.76 - 3.4	Intrón
		CT+TT	21.57	0.08				
		C	80	93	0.001	3.09	2.84 - 3.36	
		T	20	7				
	rs2234900 (T>C)	TT	82.35	99.96	0.001	5.59	5.55 - 7.21	Exón
		TC+CC	17.65	0.04				
		T	83	97	0.000002	6.61	6.03 - 7.27	
		C	17	3				
	rs1805011 (A>C)	AA	82.35	99.97	0.0004	7.03	6.97 - 9.10	Exón
		AC+CC	17.65	0.03				
		A	83	97	0.000001	7.58	6.91 - 8.35	
		C	17	3				
rs1805015 (T>C)	TT	82.35	99.98	0.0001	9.43	9.34 - 12.25	Exón	
	TC+CC	17.65	0.02					
	T	84	98	0.000001	8.25	7.52 - 9.10		
	C	16	2					
rs1805016 (T>G)	TT	82.35	99.98	0.0001	9.43	9.34 - 12.25	Exón	
	TG+GG	17.65	0.02					
	T	83	99	0.000000002	17.9	16.29 - 19.84		
	G	17	1					
ATG16L1	rs2289474 (C>T)	CC	90.2	99.97	0.049	3.58	3.17 - 4.05	Intrón
		CT+TT	9.8	0.03				
		C	90	97	0.003	4.13	3.78 - 4.51	
		T	10	3				
	rs2241880 (A>G)	AA	90.2	99.97	0.049	3.58	3.17 - 4.05	Exón
		AG+GG	9.8	0.03				
		A	91	97	0.007	3.68	3.37 - 4.01	
		G	9	3				

Continuación								
ATG16L1	rs1045100 (T>C)	TT	88.24	99.97	0.016	4.39	3.85 - 4.95	3'-UTR
		TC+CC	11.76	0.03				
		T	89	97	0.001	4.59	4.20 - 5.02	
		C	11	3				
	rs3816234 (G>A)	GG	86.27	99.98	0.002	7.02	6.13 - 7.98	Intrón
		GA+AA	13.73	0.02				
		G	88	98	0.00004	7.13	6.50 - 7.85	
		A	12	2				
IL-12B	rs3212227 (T>G)	TT	78.43	99.92	0.01	3.13	2.76 - 3.49	3'-UTR
		TG+GG	21.57	0.08				
		T	81	92	0.002	2.75	2.54 - 2.98	
		G	19	8				
IL-6	rs2069844 (C>A)	CC	88.24	99.96	0.035	3.49	3.08 - 3.91	Intrón
		CA+AA	11.76	0.04				
		C	0.93	0.98	0.013	3.95	3.62 - 4.31	
		A	0.07	0.02				
IL-6R	rs2228144 (G>A)	GG	82.35	99.99	0.000004	28.57	28.27 - 37.45	Exón
		GA+AA	17.65	0.01				
		G	82	99	1.00E-10	28.86	26.25 - 32.04	
		A	18	1				
NOD1	rs2075821 (C>T)	CC	94.12	99.99	0.03	8.39	7.32 - 9.57	Exón
		CT+TT	5.88	0.01				
		C	96	99	0.028	5.52	5.04 - 6.06	
		T	4	1				
NF-κB	rs230525 (G>A)	GG	74.51	99.91	0.005	3.24	2.85 - 3.61	Intrón
		GA+AA	25.49	0.09				
		G	79	91	0.003	2.57	2.38 - 2.79	
		A	21	9				
NOD2	rs2067085 (C>G)	CC	92.16	99.99	0.007	11.4	9.94 - 13.06	Exón
		CG+GG	7.84	0.01				
		C	92	99	0.0001	11.49	10.46 - 12.69	
		G	8	1				

<sup>1</sup> Muestra el cambio del alelo mayor o de referencia por el alelo menor o de riesgo.

<sup>2</sup> OR: Odds ratio.

<sup>3</sup> IC: Intervalo de confianza.

ii) Genes que codifican proteínas citoplasmáticas.

12 SNPs fueron localizados y se describen a continuación:

NOD1 presentó un SNP en el exón 3 con rs2075821 (C>T) (Fig. 5).

Un SNP se localizó en el exón 2 de NOD2, con rs2067085 (C>G) (Fig. 5).

Seis SNPs se identificaron para CARD8: rs2288876 (A>G) está en el exón 5, rs17665482 (G>C) y rs2288877 (T>C) son SNPs intrónicos ubicados entre el exón 5-6, y 6-7 respectivamente. Mientras que rs3745718 (T>C), rs8105324 (G>A) y rs4802445 (T>C) se localizaron en el exón 13 (Fig. 5).

Los últimos cuatro SNPs se ubicaron en ATG16L1. El primero, rs2289474 (C>T) en un intrón entre el exón 7-8. El segundo, rs2241880 (A>G) ubicado en el exón 8 y el tercero, rs3816234 ubicado en un intrón entre el exón 9-10, mientras que el cuarto con rs1045100 (T>C) se encontró en la región 3'-UTR (Fig. 5).

iii) Genes que codifican proteínas extracelulares.

Se encontraron 2 SNPs. rs1474347 (C>A) se identificó en la región intrónica de IL-6 entre el exón 4-5, y rs3212227 (T>G) se identificó en la región 3'-UTR de IL-12B (Fig. 6).

iv) Gen que codifica para la proteína nuclear NF- $\kappa$ B.

Se identificó 1 SNP intrónico ubicado entre el exón 4-5, con rs230525 (G>A) (Fig. 7).

Finalmente, 3 SNPs fueron localizados en CACNA1C. Un SNP, rs1544514 (G>A) en el exón 4. El segundo SNP, rs216009 (T>C) se encontró en una región intrónica entre el exón 29-30 y uno más en la región 3'-UTR (rs7957163 C>A) (Fig. 8).

## 9. Discusión

Diversos estudios a nivel mundial apoyan la existencia de la influencia genética en el riesgo de NPT al identificar SNPs en genes inflamatorios asociados con este desenlace (Strauss y cols., 2018; Ribeiro de Andrade Ramos y da Silva, 2018). La presencia de los SNPs ya reportados, no implica que sean similares entre distintas poblaciones, por lo que es necesario este tipo de estudio en cada población. Si bien los estudios en América Latina son limitados, en nuestro país no existen aún reportes de búsqueda de SNPs asociados a este evento y que se realicen a partir de un diseño personalizado de genes candidatos.

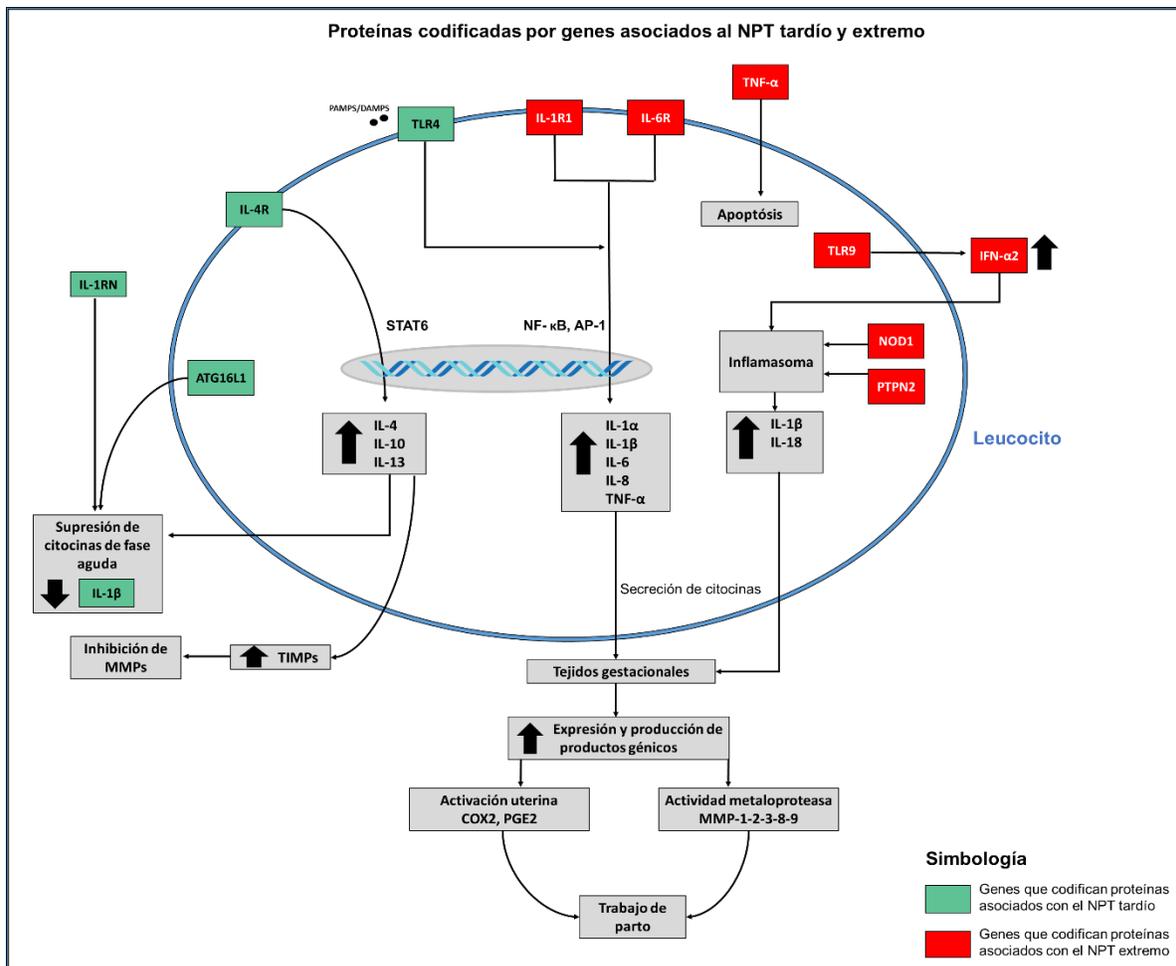
Con la finalidad de determinar la influencia genética en el riesgo de presentar nacimiento prematuro relacionado con diferentes tipos de genes, se invitó a participar a mujeres cuyo desenlace en su gestación fuera pretérmino o término. Se identificó un conjunto de SNPs involucrados con la respuesta inflamatoria y en asociación con el nacimiento prematuro espontáneo.

En este estudio las mujeres con desenlace de NPT fueron clasificadas de acuerdo con su edad gestacional (Fig. 2). Se observó que el número de mujeres con desenlace de NPT extremo y tardío, fue similar entre ambos grupos de estudio. Si bien esto puede deberse a la casualidad, también puede ser el reflejo de las variaciones genéticas individuales, las cuales podrían explicar la etiología de los partos prematuros tempranos y tardíos.

En un primer análisis, al comparar los SNPs localizados en mujeres con desenlace de prematuridad de diferentes SDG, se encontró que un conjunto de SNPs estaban asociados con diferentes genes, de los cuales, un grupo de ellos, era propio de mujeres con desenlace de NPT tardío, mientras que otro grupo, era propio de mujeres con resolución de prematuridad extrema. Las diferencias en los genes tardío y extremo, pueden llevar a la activación de diferentes moléculas que participan en el trabajo de parto y podría explicar el nacimiento en las diferentes SDG (Fig. 10).

Las proteínas codificadas por el grupo de mujeres que expresan genes tardíos y extremos, se localizan en células del sistema inmune. Los genes expresados en mujeres con NPT tardío inducen predominantemente una respuesta antiinflamatoria. ATG16L1 e IL-1RN suprimen la síntesis de citocinas de fase aguda a partir del proceso de autofagia (Okai y cols., 2022) y mediante la inhibición competitiva de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  con su receptor (Pandey y cols., 2017). TLR4 inicia una respuesta inflamatoria a partir de su unión con PAMPS y DAMPS, por lo que su activación puede ser causada por presencia o ausencia de infección (Robertson y cols., 2020). Por otra parte, IL-4R conduce a la secreción de citocinas TH2 (IL-4, IL-10 e IL-13) (McCormick y Heller, 2015) y a la producción de inhibidores de metaloproteasas de matriz extracelular (TIMPs) (Bhattacharjee y cols., 2013), lo cual promueve un ambiente antiinflamatorio en los tejidos gestacionales (membranas fetales, miometrio, cérvix) (Fig. 11).

Por otra parte, los genes detectados en mujeres con NPT extremo, se sitúan más sobre un tipo de respuesta proinflamatoria, ya que estimulan principalmente la expresión de citocinas de fase aguda (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas atrayentes de neutrófilos (IL-8). Los receptores de IL-1 e IL-6, inducen la síntesis de estas moléculas a partir de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Acuner y cols., 2014; Luo y Zheng, 2016) mientras que TNF- $\alpha$  promueve un perfil inflamatorio a través de la inducción de la apoptosis (Sabio y Davis, 2014). Por último, IFN- $\alpha$ 2, TLR9, NOD1, y PTPN2, regulan la síntesis de IL-1 $\beta$  e IL-18 a partir de la activación del inflamasoma (Kopitar-Jerala, 2017; Kawasaki y Kawai, 2014; Moreira y Zamboni, 2012; Spalinger y cols., 2018). La expresión elevada de citocinas y quimiocinas en los tejidos gestacionales, disminuyen los mecanismos antiinflamatorios de tolerancia al embarazo, lo que promueve una elevada expresión de genes de activación uterina (prostaglandinas, oxitocinas) y enzimas de remodelación de tejidos (MMP-1-2-8-9), lo que impulsa la progresión hacia el parto (Robertson y cols., 2020; Vrachnis y cols., 2012; Kitanaka y cols., 2019) (Fig. 11).



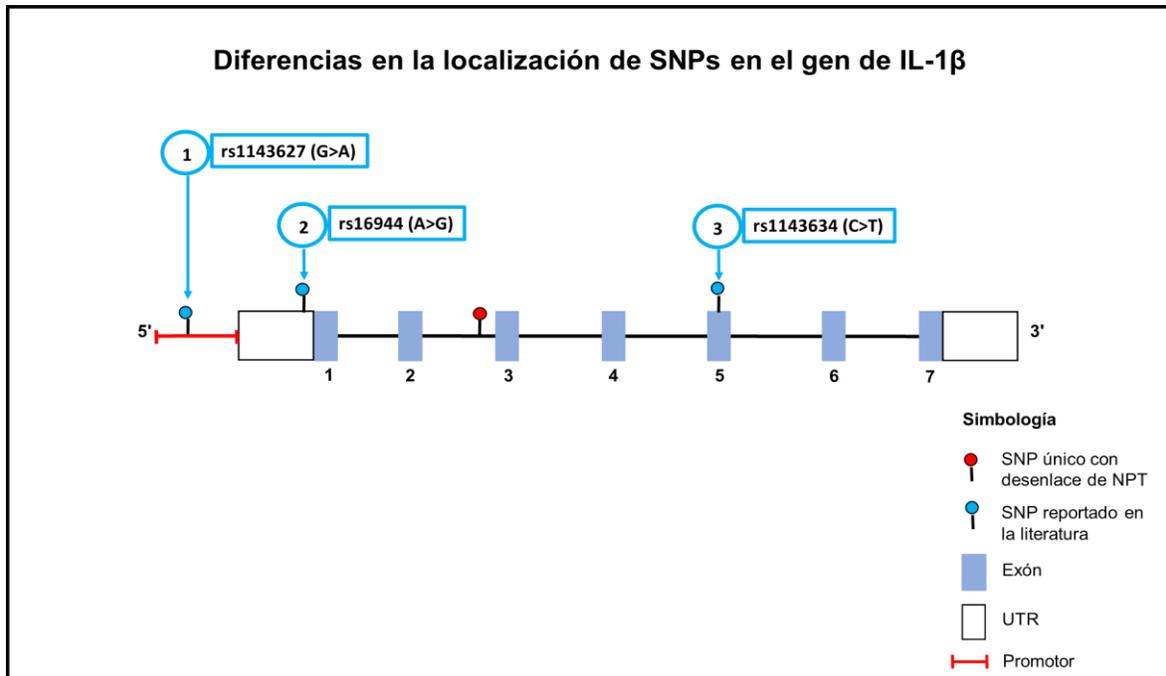
**Figura 11.** Localización de las proteínas codificadas por los genes asociados al NPT tardío y extremo en células del sistema inmune. También se muestran las moléculas inducidas por el producto de estos genes y el efecto que tienen en los tejidos gestacionales.

Se observó que los SNPs asociados con la prematuridad extrema se localizaron en regiones intrónicas, mientras que los SNPs asociados con la prematuridad tardía fueron ubicados en su mayoría, en regiones 3'-UTR. Esto señala la existencia de regiones específicas y altamente polimórficas para cada categoría de prematuridad, las cuales podrían conferir diferente susceptibilidad para un nacimiento en distintas SDG.

En este estudio se observó la presencia de SNPs ya reportados en la literatura, como el SNP rs2228144 (G>A) en el gen de IL-6R el cual se comparte con mujeres chilenas (Romero y cols., 2010) (Tabla 6) y el SNP rs5744168 (G>A) del gen de

TLR5 reportado en neonatos de ascendencia europea prematuros (Sampath y cols., 2012) (Tabla 5).

Se encontró que la ubicación de varios SNPs difiere aun tratándose del mismo gen, como es el caso de IL-1 $\beta$ , cuyos SNPs varían en su ubicación (Fig. 12).



**Figura 12.** SNPs reportados en población: 1. danesa (Hollegaard y cols., 2008), 2. uruguaya (Pereyra y cols., 2016) y 3. chilena (Romero y cols., 2010).

Por otra parte, se encontraron SNPs en los genes: CARD8, NF- $\kappa$ B, NOD1, IL-8, IL-12B y PTPN2 que no han sido reportados previamente. Cabe mencionar, que en neonatos, para CARD8 se han encontrado evidencias en SNPs (Modi y cols., 2017), mientras que para IL-12B a nivel de proteína sérica (Lavoie y cols., 2010). En mujeres, para NF- $\kappa$ B, NOD1 y PTPN2 solo a nivel de expresión de RNAm (Zhu y cols., 2018; Adel y cols., 2017) y para IL-8 a nivel de proteína sérica (Suryanegara y Kawilarang, 2017). Los resultados citados han sido asociados con desenlace de NPT y RPM.

Los SNPs localizados en genes que movilizan el calcio intracelular, son importantes ya que las proteínas que codifican participan en vías de señalización que favorecen

la contractilidad uterina (Banciu y cols., 2018; Grigsby y cols., 2006; Giulietti y cols., 2014). Mientras que los SNPs de genes asociados a la síntesis y transporte de serotonina pueden tener relevancia en el embarazo, ya que las proteínas codificadas, están implicadas con la deficiencia de serotonina placentaria, lo cual provoca inhibición en el crecimiento fetal y su posible asociación al NPT (Ranzil y cols., 2019) (Fig. 13).

El haber realizado un análisis estadístico de casos y controles, permitió identificar SNPs con una alta frecuencia en el grupo con desenlace de NPT, que no se habían detectado, además de identificar una serie de genotipos y alelos menores que influyen en el riesgo de desarrollar NPT.

De los 27 genotipos identificados con riesgo para la prematurez (Tabla 6), llama la atención que 17 de ellos, obtuvieron la asociación más significativa con este desenlace, ya que la distribución en su frecuencia fue notablemente mayor en el grupo de mujeres con NPT, con respecto a aquellas con NT. Los SNPs que comprenden estos 17 genotipos, se localizaron en los genes de: IL-4R (rs2072130 (C>T), rs3024622 (C>G), rs2234900 (T>C), rs1805011 (A>C), rs1805015 (T>C), rs1805016 (T>G), CARD8 (rs17665482 (G>C), rs2288876 (A>G), rs8105324 (G>A), rs4802445 (T>C), rs3745718 (T>C)), ATG16L1 (rs1045100 (T>C)), rs3816234 (G>A), IL-6R (rs2228144 (G>A), NOD2 (rs2067085 (C>G)), NF-κB (rs230525 (G>A)) e IL-12B (rs3212227 (T>G)). Además, se pudo observar que la distribución de estos SNPs se localizaba principalmente en las regiones codificantes de cada gen.

Es importante resaltar que al evaluar las frecuencias alélicas, se observó que el alelo menor para los 17 SNPs antes mencionados, presentaron las asociaciones más significativas con el NPT. Curiosamente al analizar estos alelos, llama la atención que el alelo "A" del SNP rs2228144 (G>A) del gen IL-6R, fue el que obtuvo el valor de riesgo más elevado, al presentar un OR de 28. No somos los primeros en identificar este alelo en mujeres con desenlace de prematurez, ya que, como se

mencionó anteriormente, este SNP también fue encontrado en mujeres chilenas (Romero y cols., 2010). Estos hallazgos fortalecen la probabilidad de una asociación del alelo menor de este gen con la prematuridad, lo que respalda los resultados.

Las similitudes en las frecuencias genotípicas y alélicas para los 17 SNPs comentados, sugiere que su presencia en las mujeres puede tener un papel relevante en la patogénesis del NPT.

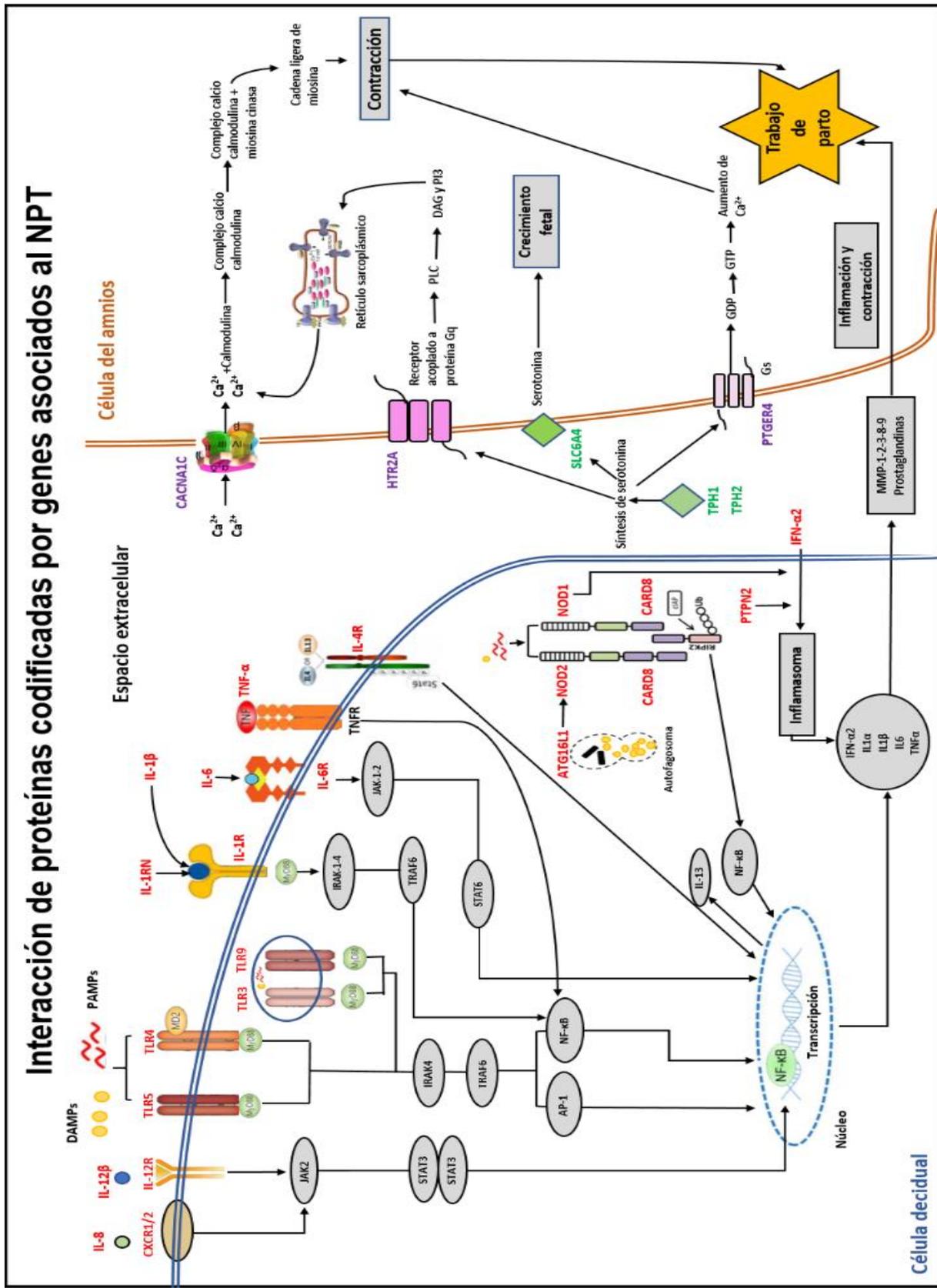
Los hallazgos de este estudio, sugieren que los SNPs de riesgo, participan en genes involucrados con la inflamación de los tejidos gestacionales, la contracción del miometrio y el metabolismo y transporte de serotonina, los cuales pueden inducir el trabajo de parto a partir de diferentes vías de señalización. Por lo tanto, la activación de vías diferentes pueden confluír en el parto pretérmino. (Fig 13).

### **Limitaciones del estudio**

Este estudio tiene varias limitaciones que deben tenerse en cuenta en estudios futuros que examinen las asociaciones genéticas con el parto prematuro. Si bien el tamaño de muestra utilizado permitió identificar SNPs asociados significativamente con el riesgo de presentar NPT, es necesario validar estos hallazgos en nuestra población y examinar el efecto de los factores ambientales. Además, es necesario estudiar el impacto funcional de los SNPs y sus implicaciones fisiológicas relacionadas con esta patología. Otra limitante es que el diseño de las sondas de captura, no incluyó las regiones promotoras de los genes candidatos, las cuales, pueden tener relevancia en la prematuridad, ya informes previos las han asociado con la presencia de múltiples polimorfismos de riesgo (Ribeiro de Andrade Ramos y da Silva, 2018; Pandey y cols., 2017).

La estrategia utilizada en este estudio para estimar la ascendencia de casos y controles basada en etnicidad autoinformada, puede ser una limitante para evaluar la ascendencia biológica de los individuos, ya que puede llevar a una estratificación de la población y a una confusión en las asociaciones de los SNPs con la

prematurez (asociaciones espurias), lo cual puede resultar en falsos positivos o negativos. Es necesario realizar un ajuste en la estructura de la población de casos y controles, o realizar una estimación genética basada en datos cuantitativos de ancestría global (africana, europea, asiática) para una caracterización más precisa, utilizando para ello, marcadores informativos de ascendencia. También es necesario controlar los factores de riesgo no genéticos, como los factores demográficos y socioambientales (ingresos, educación) para evitar inferencias injustificadas sobre la magnitud de la influencia genética (Mersha y Abebe, 2015).



**Figura 13.** Relación de las proteínas codificadas por los diferentes genes que estuvieron implicados en el estudio. Las letras en color rojo muestran la ubicación de las proteínas inflamatorias; en morado las proteínas implicadas con el movimiento de calcio, y el color verde, aquellas implicadas en la síntesis y transporte de serotonina placentaria.

## **10. Conclusión**

La importancia de los resultados de este estudio, radica en que se describen los primeros SNPs encontrados en genes de mujeres con desenlace de NPT en población mexicana. Si bien, su hallazgo no evita la patología, ayudaría en mucho a predecir en la mujer gestante, el riesgo a tener este desenlace.

Además, permitió identificar SNPs específicos para diferentes etapas de la gestación, lo cual podría ayudar en la clínica a la prevención, diagnóstico y tratamiento del parto pretérmino.

Finalmente, la realización de este estudio permitió la comparación de la frecuencia en la distribución de los genotipos a partir del modelo de herencia dominante, evaluando la influencia del alelo menor con la susceptibilidad a desarrollar NPT.

## 12. Referencias bibliográficas

Acuner Ozbabacan, S. E., Gursoy, A., Nussinov, R., & Keskin, O. 2014. The structural pathway of interleukin 1 (IL-1) initiated signaling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer. *PLoS computational biology*, 10(2): e1003470.

Adel, S., Mansour, A., Louka, M., Matboli, M., Elmekawi, S. F., & Swelam, N. 2017. Evaluation of MicroRNA-210 and Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 in Pre-eclampsia. *Gene*, 596: 105–109.

Agilent. 2018. Haloplex publications. Consultado el 16 de noviembre de 2019 en: <https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/5991-8940EN.PDF>

Agilent. 2020. Agilent SureCall 4.1.2. Consultado el 18 de agosto de 2020 en: <https://www.agilent.com/cs/library/software/public/Release%20Notes%20SureCall%204.1.pdf>.

Andalas, M., Hakimi, M., Nurdianti, D. S., Astuti, I., Imran, I., Harapan, H. 2015. Association of –308G/A TNF- $\alpha$  gene polymorphism and spontaneous preterm birth in Acehese ethnic group, Indonesia: This polymorphism is not associated with preterm birth. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*.1-8.

Anderson, J. G., Baer, R. J., Partridge, J. C., Kuppermann, M., Franck, L. S., Rand, L., Jelliffe-Pawlowski, L. L., & Rogers, E. E. 2016. Survival and Major Morbidity of Extremely Preterm Infants: A Population-Based Study. *Pediatrics*, 138(1): e20154434.

Avila-Vergara, M. A., Peraza-Garay, F. J., Meraz-Cruz, N., Hernandez-Guerrero, C., Palacios-Gonzalez, B., & Vadillo-Ortega, F. 2018. Association of Intron-2 Variable Numbers of an 86-bp Tandem Repeat-Polymorphisms of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene and Idiopathic Recurrent Spontaneous Abortion. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 70(2): 96–102.

Banciu, A., Banciu, D. D., Mustaciosu, C. C., Radu, M., Cretoiu, D., Xiao, J., Cretoiu, S. M., Suci, N., & Radu, B. M. 2018. Beta-Estradiol Regulates Voltage-Gated Calcium Channels and Estrogen Receptors in Telocytes from Human Myometrium. *International journal of molecular sciences*, 19(5): 1413.

Başbuğ, D., Başbuğ, A., & Gülerman, C. 2017. Is unexplained elevated maternal serum alpha-fetoprotein still important predictor for adverse pregnancy outcome?. *Ginekologia polska*, 88(6): 325–330.

Bediako, P. T., BeLue, R., & Hillemeier, M. M. 2015. A Comparison of Birth Outcomes Among Black, Hispanic, and Black Hispanic Women. *Journal of racial and ethnic health disparities*, 2(4): 573–582.

Bhattacharjee, A., Shukla, M., Yakubenko, V. P., Mulya, A., Kundu, S., & Cathcart, M. K. 2013. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free radical biology & medicine*, 54: 1–16.

Boyd, H. A., Poulsen, G., Wohlfahrt, J., Murray, J. C., Feenstra, B., & Melbye, M. 2009. Maternal contributions to preterm delivery. *American journal of epidemiology*, 170(11): 1358–1364.

Bremner, L., Gill, C., Seed, P. T., Conti-Ramsden, F., Webster, L., Fleminger, J., Chappell, L. C., Shennan, A., & Bramham, K. 2022. Rule-in and rule-out of pre-eclampsia using DELFIA Xpress PIGF 1-2-3 and sFlt-1: PIGF ratio. *Pregnancy hypertension*, 27, 96–102.

Burger, R. J., Temmink, S., Wertaschnigg, D., Ganzevoort, W., Reddy, M., Davey, M. A., Wallace, E. M., & Mol, B. W. 2021. Trends in preterm birth in twin pregnancies in Victoria, Australia, 2007-2017. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*, 61(1):55–62.

Burris, H. H., Lorch, S. A., Kirpalani, H., Pursley, D. M., Elovitz, M. A., & Clougherty, J. E. 2019. Racial disparities in preterm birth in USA: a biosensor of physical and social environmental exposures. *Archives of disease in childhood*, 104(10): 931–935.

Cappelletti, M., Della Bella, S., Ferrazzi, E., Mavilio, D., & Divanovic, S. 2016. Inflammation and preterm birth. *Journal of leukocyte biology*, 99(1): 67–78.

CEVECE. 2019. Nacimientos prematuros. Consultado el cuatro de enero del 2021. Consultado el 15 de agosto de 2022 en: <https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/difusion/tripticos/2019/Semana%2047.pdf>

Coria S. I. 2022. Indicadores de nacimiento pretérmino, natalidad y mortalidad (2021). Departamento de Gestión de la Información. Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

COMEGO. 2015. 12. Parto pretérmino. Guía de práctica clínica. México.

Deressa, A. T., Cherie, A., Belihu, T. M., & Tasisa, G. G. 2018. Factors associated with spontaneous preterm birth in Addis Ababa public hospitals, Ethiopia: cross sectional study. *BMC pregnancy and childbirth*, 18(1): 332.

Diaz-Cueto, L., Dominguez-Lopez, P., Cantillo-Cabarcas, J., Perez-Figueroa, G., Arechavaleta-Velasco, M. and Arechavaleta-Velasco, F. 2008, Progesterone receptor gene polymorphisms are not associated with preterm birth in a Hispanic population. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 103: 153-157.

DNAgenotek. 2018. Laboratory protocol for manual purification of DNA from 0.5 mL of sample. Consultado el 7 de junio de 2021 en: <https://www.dnagenotek.com/us/pdf/PD-PR-006.pdf>

Dominguez-Lopez, P., Diaz-Cueto, L., Arechavaleta-Velasco, M., Caldiño-Soto, F., Ulloa-Aguirre, A., & Arechavaleta-Velasco, F. 2018. The follicle-stimulating hormone receptor Asn680Ser polymorphism is associated with preterm birth in Hispanic women. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 31(5): 580–585.

Downes, K. L., Grantz, K. L., & Shenassa, E. D. 2017. Maternal, Labor, Delivery, and Perinatal Outcomes Associated with Placental Abruption: A Systematic Review. *American journal of perinatology*, 34(10): 935–957.

FIGO Working Group on Good Clinical Practice in Maternal-Fetal Medicine. 2019. Good clinical practice advice: Prediction of preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 144(3): 340–346.

Frey, H. A., Stout, M. J., Pearson, L. N., Tuuli, M. G., Cahill, A. G., Strauss, J. F., 3rd, Gomez, L. M., Parry, S., Allsworth, J. E., & Macones, G. A. 2016. Genetic variation associated with preterm birth in African-American women. *American journal of obstetrics and gynecology*, 215(2): 235.e1–235.e2358.

Giulietti, M., Vivenzio, V., Piva, F. 2014. How much do we know about the coupling of G-proteins to serotonin receptors?. *Mol Brain*, 7(1): 7-49.

Gomez-Lopez, N., Romero, R., Garcia-Flores, V., Leng, Y., Miller, D., Hassan, S. S., Hsu, C. D., & Panaitescu, B. 2019. Inhibition of the NLRP3 inflammasome can prevent sterile intra-amniotic inflammation, preterm labor/birth, and adverse neonatal outcomes. *Biology of reproduction*, 100(5): 1306–1318.

Grigsby, P. L., Sooranna, S. R., Adu-Amankwa, B., Pitzer, B., Brockman, D. E., Johnson, M. R., & Myatt, L. 2006. Regional expression of prostaglandin E2 and F2alpha receptors in human myometrium, amnion, and choriondecidua with advancing gestation and labor. *Biology of reproduction*, 75(2): 297–305.

Hamou, B., Sheiner, E., Coreanu, T., Walfisch, A., & Silberstein, T. 2020. Intrapartum cervical lacerations and their impact on future pregnancy outcome. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 33(5): 883–887.

Harper, M., Zheng, S. L., Thom, E., Klebanoff, M. A., Thorp, J., Jr, Sorokin, Y., Varner, M. W., Iams, J. D., Dinsmoor, M., Mercer, B. M., Rouse, D. J., Ramin, S. M., Anderson, G. D., & Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Maternal-Fetal Medicine Units Network (MFMU). 2011. Cytokine gene polymorphisms and length of gestation. *Obstetrics and gynecology*, 117(1): 125–130.

Hollegaard, M. V., Grove, J., Thorsen, P., Wang, X., Mandrup, S., Christiansen, M., Norgaard-Pedersen, B., Wojdemann, K. R., Tabor, A., Attermann, J., & Hougaard, D. M. 2008. Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta promoters with possible gene regulatory functions increase the risk of preterm birth. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 87(12): 1285–1290.

Ibrahim, F., Maarouf Abdel, E., Salem, O., Ahmed, S. 2018. ROLE OF BIOCHEMICAL MARKERS AND TRANSVAGINAL ULTRASOUND IN THE PREDICTION OF PRETERM LABOR. *Al-Azhar Medical Journal*, 47(1): 47-58.

Illumina. 2017. MiSeq® Reporter Software Guide. Consultado el 17 de agosto de 2020 en: [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software\\_documentation/miseqreporter/miseq-reporter-software-guide-15042295-05.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/miseqreporter/miseq-reporter-software-guide-15042295-05.pdf)

Illumina. 2022. MiSeq™ System. Speed and simplicity for targeted resequencing and small-genome sequencing. Consultado el 16 de agosto de 2020 en: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-system-data-sheet-m-gl-00006/miseq-data-sheet-m-gl-00006.pdf>

IMSS. 2017. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento del Parto pretérmino. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México.

Jun, S. Y., Lee, J. Y., Kim, H. M., Kim, M. J., Cha, H. H., & Seong, W. J. 2019. Evaluation of the effectiveness of foetal fibronectin as a predictor of preterm birth in symptomatic preterm labour women. *BMC pregnancy and childbirth*, 19(1): 241.

Kalinka, J., & Bitner, A. 2009. Ocena związku polimorfizmów genów kodujących wybrane cytokiny z występowaniem porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich [Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women]. *Ginekologia polska*, 80(2): 111–117.

Karnati, S., Kollikonda, S., & Abu-Shaweesh, J. 2020. Late preterm infants - Changing trends and continuing challenges. *International journal of pediatrics & adolescent medicine*, 7(1): 36–44.

Kawasaki, T., & Kawai, T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5: 461.

Kemp M. W. 2014. Preterm birth, intrauterine infection, and fetal inflammation. *Frontiers in immunology*, 5: 574.

Kim, H. J., Park, K. H., Kim, Y. M., Joo, E., Ahn, K., & Shin, S. 2020. A protein microarray analysis of amniotic fluid proteins for the prediction of spontaneous preterm delivery in women with preterm premature rupture of membranes at 23 to 30 weeks of gestation. *PloS one*, 15(12): e0244720.

Kitanaka, N., Nakano, R., Sakai, M., Kitanaka, T., Namba, S., Konno, T., Nakayama, T., & Sugiya, H. 2019. ERK1/ATF-2 signaling axis contributes to interleukin-1 $\beta$ -induced MMP-3 expression in dermal fibroblasts. *PloS one*, 14(9): e0222869.

Kopitar-Jerala N. 2017. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Frontiers in immunology*, 8: 873.

Latendresse G. 2009. The interaction between chronic stress and pregnancy: preterm birth from a biobehavioral perspective. *Journal of midwifery & women's health*, 54(1): 8–17.

Lavoie, P. M., Huang, Q., Jollette, E., Whalen, M., Nuyt, A. M., Audibert, F., Speert, D. P., Lacaze-Masmonteil, T., Soudeyns, H., & Kollmann, T. R. 2010. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *The Journal of infectious diseases*, 202(11):1754–1763.

Lee, T., Carpenter, M. W., Heber, W. W., & Silver, H. M. 2003. Preterm premature rupture of membranes: risks of recurrent complications in the next pregnancy among a population-based sample of gravid women. *American journal of obstetrics and gynecology*, 188(1): 209–213.

Luo, Y., & Zheng, S. G. 2016. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Frontiers in immunology*, 7: 604.

Mansukhani, S., Barber, L. J., Kleftogiannis, D., Moorcraft, S. Y., Davidson, M., Woolston, A., Proszek, P. Z., Griffiths, B., Fenwick, K., Herman, B., Matthews, N., O'Leary, B., Hulkki, S., Gonzalez De Castro, D., Patel, A., Wotherspoon, A., Okachi, A., Rana, I., Begum, R., Davies, M. N., ... Gerlinger, M. 2018. Ultra-Sensitive Mutation Detection and Genome-Wide DNA Copy Number Reconstruction by Error-

Corrected Circulating Tumor DNA Sequencing. *Clinical chemistry*, 64(11): 1626–1635.

Manuck T. A. 2017. Racial and ethnic differences in preterm birth: A complex, multifactorial problem. *Seminars in perinatology*, 41(8): 511–518.

McCormick, S. M., & Heller, N. M. 2015. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*, 75(1): 38–50.

Mendelson, C. R., Gao, L., & Montalbano, A. P. 2019. Multifactorial Regulation of Myometrial Contractility During Pregnancy and Parturition. *Frontiers in endocrinology*, 10: 714.

Menon, R., & Richardson, L. S. 2017. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Seminars in perinatology*, 41(7): 409–419.

Mersha, T. B., & Abebe, T. 2015. Self-reported race/ethnicity in the age of genomic research: its potential impact on understanding health disparities. *Human genomics*; 9(1), 1.

Modi, B. P., Parikh, H. I., Teves, M. E., Kulkarni, R., Liyu, J., Romero, R., York, T. P., & Strauss, J. F., 3<sup>rd</sup>. 2018. Discovery of rare ancestry-specific variants in the fetal genome that confer risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM) and preterm birth. *BMC medical genetics*, 19(1): 181.

Modi, B. P., Teves, M. E., Pearson, L. N., Parikh, H. I., Haymond-Thornburg, H., Tucker, J. L., Chaemsaitong, P., Gomez-Lopez, N., York, T. P., Romero, R., & Strauss, J. F., 3<sup>rd</sup>. 2017. Mutations in fetal genes involved in innate immunity and host defense against microbes increase risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Molecular genetics & genomic medicine*, 5(6): 720–729.

Moreira, L. O., & Zamboni, D. S. 2012. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology*, 3: 328.

Murray, S. R., Stock, S. J., & Norman, J. E. 2017. Long-term childhood outcomes after interventions for prevention and management of preterm birth. *Seminars in perinatology*, 41(8): 519–527.

Murtha, A. P., Nieves, A., Hauser, E. R., Swamy, G. K., Yonish, B. A., Sinclair, T. R., & Heine, R. P. 2006. Association of maternal IL-1 receptor antagonist intron 2 gene polymorphism and preterm birth. *American journal of obstetrics and gynecology*, 195(5):1249–1253.

Natarajan, G., Shankaran, S. 2016. Short- and Long-Term Outcomes of Moderate and Late Preterm Infants. *American journal of perinatology*, 33(3): 305–317.

Ng P. C. 2000. The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 82(3): F250–F254.

Nishimura, F., Mogami, H., Moriuchi, K., Chigusa, Y., Mandai, M., & Kondoh, E. 2020. Mechanisms of thrombin-Induced myometrial contractions: Potential targets of progesterone. *PloS one*, 15(5): e0231944.

Okai N., Watanabe T., Minaga K., Kamata K., Honjo H., Kudo M. 2022. Alterations of autophagic and innate immune responses by the Crohn's disease-associated ATG16L1 mutation. *World J Gastroenterol*, 28(26): 3063-3070.

Oliveira, K. A., Araújo, E. M., Oliveira, K. A., Casotti, C. A., Silva, C., & Santos, D. 2018. Association between race/skin color and premature birth: a systematic review with meta-analysis. *Revista de saude publica*, 52: 26.

Oskovi Kaplan, Z. A., & Ozgu-Erdinc, A. S. 2018. Prediction of Preterm Birth: Maternal Characteristics, Ultrasound Markers, and Biomarkers: An Updated Overview. *Journal of pregnancy*. 8367571.

Padeh, E., Wainstock, T., Sheiner, E., Landau, D., & Walfisch, A. 2019. Gestational age and the long-term impact on children's infectious urinary morbidity. *Archives of gynecology and obstetrics*, 299(2): 385–392.

Pandey, M., Chauhan, M., & Awasthi, S. 2017. Interplay of cytokines in preterm birth. *The Indian journal of medical research*, 146(3): 316–327.

Pereyra, S., Bertoni, B., & Sapiro, R. 2016. Interactions between environmental factors and maternal-fetal genetic variations: strategies to elucidate risks of preterm birth. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 202: 20–25.

Pértegas, S., Pita, S. 2002. Cálculo del tamaño muestral en estudios de casos y controles. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña. *Cad Aten Primaria*; 9: 148-150.

Pinto, F., Fernandes, E., Virellad, D., Abrantesa, A., Netod, M. T. 2018. Born Preterm: A Public Health Issue. *Portuguese Journal of Public Health*, 37:38–49.

Porter, T. F., Fraser, A. M., Hunter, C. Y., Ward, R. H., & Varner, M. W. 1997. The risk of preterm birth across generations. *Obstetrics and gynecology*, 90(1): 63–67.

Ranzil, S., Ellery, S., Walker, D. W., Vaillancourt, C., Alfaidy, N., Bonnin, A., Borg, A., Wallace, E. M., Ebeling, P. R., Erwich, J. J., & Murthi, P. 2019. Disrupted placental serotonin synthetic pathway and increased placental serotonin: Potential implications in the pathogenesis of human fetal growth restriction. *Placenta*, 84: 74–83.

Reyna-Villasmil, E., Mejia-Montilla, J., Reyna-Villasmil, N., Torres-Cepeda, D., Santos-Bolivar, J., Rondón-Tapía, M., Fernández-Ramírez, A. 2017. Metaloproteínasa de la matriz 9 cervicovaginal en el segundo trimestre para la predicción de parto pretérmino. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31 (1): 10-15.

Reyna-Villasmil, E., Mejia-Montilla, J., Reyna-Villasmil, N., Torres-Cepeda, D., Santos-Bolivar, J., Rondón-Tapía, M., Fernández-Ramírez, A. 2016. Interleucina 6 cervicovaginal en la predicción de partopretérmino. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 62 (2): 175-181.

Ribeiro de Andrade Ramos, B., & da Silva, M. G. 2018. The Burden of Genetic and Epigenetic Traits in Prematurity. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 25(4): 471–479.

Robertson, S. A., Hutchinson, M. R., Rice, K. C., Chin, P. Y., Moldenhauer, L. M., Stark, M. J., Olson, D. M., & Keelan, J. A. 2020. Targeting Toll-like receptor-4 to tackle preterm birth and fetal inflammatory injury. *Clinical & translational immunology*, 9(4): e1121.

Rodríguez-Sánchez, I. P., Suárez-Caro, S., Rivas-Solís, F., Delgado-Enciso, I., Sánchez-Chaparro, M. M., Gómez-Govea, M. A., Martínez-de-Villarreal, L. E., & Valdez-Velazquez, L. L. 2016. Association of the polymorphism 12109g>A from the REN gene as a risk factor for preterm birth. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*, 17(4): 1470320316678159.

Romero, R., Velez Edwards, D. R., Kusanovic, J. P., Hassan, S. S., Mazaki-Tovi, S., Vaisbuch, E., Kim, C. J., Chaiworapongsa, T., Pearce, B. D., Friel, L. A., Bartlett, J., Anant, M. K., Salisbury, B. A., Vovis, G. F., Lee, M. S., Gomez, R., Behnke, E., Oyarzun, E., Tromp, G., Williams, S. M., ... Menon, R. 2010. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 202(5): 431.e1–431.e4334.

Sabio, G., & Davis, R. J. 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology*, 26(3): 237–245.

Shahshahan, Z., & Hashemi, L. 2014. Maternal serum cytokines in the prediction of preterm labor and response to tocolytic therapy in preterm labor women. *Advanced biomedical research*, 3: 126.

Simmons, L. E., Rubens, C. E., Darmstadt, G. L., & Gravett, M. G. 2010. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Seminars in perinatology*, 34(6): 408–415.

Sampath, V., Garland, J. S., Le, M., Patel, A. L., Konduri, G. G., Cohen, J. D., Simpson, P. M., & Hines, R. N. 2012. A TLR5 (g.1174C > T) variant that encodes a stop codon (R392X) is associated with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric pulmonology*, 47(5): 460–468.

Sheikh, I. A., Ahmad, E., Jamal, M. S., Rehan, M., Assidi, M., Tayubi, I. A., AlBasri, S. F., Bajouh, O. S., Turki, R. F., Abuzenadah, A. M., Damanhour, G. A., Beg, M. A., & Al-Qahtani, M. 2016. Spontaneous preterm birth and single nucleotide gene polymorphisms: a recent update. *BMC genomics*, 17(Suppl 9): 759.

Souza, R. T., & Cecatti, J. G. 2020. A Comprehensive Integrative Review of the Factors Associated with Spontaneous Preterm Birth, Its Prevention and Prediction, Including Metabolomic Markers. Uma revisão integrativa abrangente dos fatores associados ao parto prematuro espontâneo, sua prevenção e predição, incluindo marcadores metabolômicos. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*, 42(1): 51–60.

Sovio, U., Gaccioli, F., Cook, E., Hund, M., Charnock-Jones, D. S., & Smith, G. C. 2017. Prediction of Preeclampsia Using the Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 to Placental Growth Factor Ratio: A Prospective Cohort Study of Unselected Nulliparous Women. *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), 69(4): 731–738.

Spalinger, M. R., Manzini, R., Hering, L., Riggs, J. B., Gottier, C., Lang, S., Atrott, K., Fettelschoss, A., Olomski, F., Kündig, T. M., Fried, M., McCole, D. F., Rogler, G., & Scharl, M. 2018. PTPN2 Regulates Inflammasome Activation and Controls Onset of Intestinal Inflammation and Colon Cancer. *Cell reports*, 22(7): 1835–1848.

Strauss, J. F., 3rd, Romero, R., Gomez-Lopez, N., Haymond-Thornburg, H., Modi, B. P., Teves, M. E., Pearson, L. N., York, T. P., & Schenk, H. A. 2018. Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *American journal of obstetrics and gynecology*, 218(3): 294–314.e2.

Suryanegara, K., Kawilarang, S. 2017. Difference of Maternal Serum Interleukin-8 in Preterm Labor and Normal Pregnancy. *Med J Obstet Gynecol* 5(4): 1108.

Svensson, A. C., Sandin, S., Cnattingius, S., Reilly, M., Pawitan, Y., Hultman, C. M., & Lichtenstein, P. 2009. Maternal effects for preterm birth: a genetic epidemiologic study of 630,000 families. *American journal of epidemiology*, 170(11): 1365–1372.

Tosto, V., Giardina, I., Tsibizova, V., Renzo, G. 2020. Preterm Birth, From the Biological Knowledges to the Prevention: An Overview. *Maternal-Fetal Medicine*, 2(3): 62-171.

Valdez, L. L., Quintero, A., Garcia, E., Olivares, N., Celis, A., Rivas, F., Jr, & Rivas, F. 2004. Thrombophilic polymorphisms in preterm delivery. *Blood cells, molecules & diseases*, 33(1): 51–56.

Velez, D. R., Fortunato, S. J., Williams, S. M., & Menon, R. 2008. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Human molecular genetics*, 17(11): 1619–1630.

Vrachnis, N., Karavolos, S., Iliodromiti, Z., Sifakis, S., Siristatidis, C., Mastorakos, G., & Creatsas, G. 2012. Review: Impact of mediators present in amniotic fluid on preterm labour. *In vivo (Athens, Greece)*, 26(5): 799–812.

Walani, Salimah R. 2020. Global burden of preterm birth. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 150(1): 31–33.

Wadhwa, P. D., Entringer, S., Buss, C., & Lu, M. C. 2011. The contribution of maternal stress to preterm birth: issues and considerations. *Clinics in perinatology*, 38(3): 351–384.

WHO. 2018. Preterm birth. Consultado el treinta y uno de octubre del 2021 en: <http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/preterm-birth>

Wilcox, A. J., Skjaerven, R., & Lie, R. T. 2008. Familial patterns of preterm delivery: maternal and fetal contributions. *American journal of epidemiology*, 167(4): 474–479.

Witte, A., Le Cocq, C., Ghosh, J. 2019. Agilent HaloPlex Target Enrichment System. Design and Analysis of Clinical Research Panels. Consultado el 16 de noviembre de 2019 en: <http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/agilent-haloplex-target-enrichment-system-design-and-analysis-clinical-research-panels.pdf>

Zeng, S., Yu, L., Ding, Y., Yang, M. 2021. Maternal Serum EG-VEGF as A First Trimester Predictor of Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Prospective Cohort Study. *Research Square*, (1): 11-15.

Zhang, G., Srivastava, A., Bacelis, J., Juodakis, J., Jacobsson, B., & Muglia, L. J. 2018. Genetic studies of gestational duration and preterm birth. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, 52: 33–47.

Zhu, L., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, W., & Zhu, J. 2018. Expression of NOD1 and downstream factors in placenta, fetal membrane and plasma from pregnancies with premature rupture of membranes and their significance. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(12): 5745–5754.

**BIBLIOGRAFÍA I**  
**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### “Genómica del nacimiento pretérmino”

Investigador Principal: Dra. Noemi Meraz Cruz Teléfonos:

Se le invita a participar en un estudio de investigación realizado por la Facultad de Medicina, UNAM y el Instituto Nacional de Medicina Genómica que tiene por objeto conocer si la información genética, que es aquella que heredamos de nuestros padres y damos a nuestros hijos, influye de alguna manera en el desarrollo del nacimiento pretérmino.

**PROPÓSITO:** El propósito de este estudio es tratar de identificar la información genética que está presente en los padres y en sus hijos que fueron afectados por un nacimiento pretérmino.

Se llama de esta manera a los embarazos que terminan antes de los 9 meses que dura la gestación humana. Este es un problema de salud grave, costoso y que deja muchas secuelas.

**METODOLOGÍA:** Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, se le tomará una muestra de saliva, bajo algunas indicaciones especiales y también al momento del parto se tomarán 2 mL de sangre provenientes del cordón umbilical, este procedimiento no afectará su salud o la de su hijo, no le molestará, ni le provocará ningún daño. La saliva y la sangre así obtenidas serán procesadas para extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN), que es el material en el que se encuentra la información genética. El ADN será utilizado para analizar y comparar toda la información genética de usted y de su hijo. Esta información requiere ser comparada con la obtenida de sujetos que no fueron afectados por el nacimiento pretérmino y de esta manera concluir las diferencias. Por esta razón, aunque usted no haya tenido un nacimiento pretérmino, se le está invitando también al estudio.

**RIESGOS:** No existe algún riesgo en la toma de la saliva y de sangre de cordón umbilical de ustedes y del recién nacido.

**COSTOS Y RIESGOS FINANCIEROS:** Los procedimientos y estudios serán proporcionadas sin algún costo. Como participante del estudio, tendrá que pagar los procedimientos normales de atención de su embarazo y parto.

**BENEFICIOS:** Ninguno de los participantes recibirá un beneficio directo al participar en este estudio, pero ayudarán a determinar si la información genética influye en el desarrollo del nacimiento pretérmino y de esta manera colaborarán a conocer mejor

la enfermedad y eventualmente ayudarán a proponer nuevos enfoques de prevención de la enfermedad en el futuro.

**ALTERNATIVAS:** Si usted decide no participar en el estudio su cuidado hospitalario y el de su hijo no se verá afectado de ninguna manera.

**COMPENSACIÓN:** No existirá algún tipo de compensación por su participación.

**CONFIDENCIALIDAD:** Se tendrá especial cuidado en mantener toda la información obtenida en este estudio estrictamente confidencial, excepto la información que la ley requiera. El ADN obtenido en este estudio será utilizado estrictamente para los objetivos de comparación de todos los genes, que son alrededor de 36,000. Cualquier excedente, será eliminado con las precauciones debidas que marca la ley y no será utilizado para ningún otro fin. En caso de que los resultados de este estudio se publiquen su nombre no será mencionado.

**INFORMACIÓN ADICIONAL:** Cualquier tipo de información que se identifique durante el estudio y que perjudique su bienestar, le será informado de modo inmediato.

**ABANDONO DEL ESTUDIO:** Usted debe entender que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y también es importante que sepa que se podrá retirar del estudio en cualquier momento, sin que esto afecte su atención médica presente o futura.

**LESIONES /COMPLICACIONES:** En caso de cualquier lesión física como resultado de la metodología del estudio se le proporcionará atención y tratamiento médico sin costo alguno para usted. Sin embargo, no se le dará ningún tipo de compensación económica por parte de la Facultad de Medicina, UNAM ni por el Instituto Nacional de Medicina Genómica. En el caso de que se presente algún tipo de gasto médico no atribuible a las condiciones del estudio, éste deberá ser financiado por usted o por la persona responsable de sus gastos.

**DERECHOS DEL SUJETO:** Si usted requiere obtener mayor información acerca de sus derechos como sujeto de investigación, puede contactar al director del Comité de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Es de su conocimiento que si tiene alguna duda acerca de su participación en el estudio también puede contactar al médico responsable a los teléfonos que se encuentran en la primera página.

Por favor tenga en cuenta que usted tiene la oportunidad de hacer cualquier pregunta relacionada con el estudio y que ésta le sea contestada a su entera satisfacción.

**CONCLUSIONES:**

1. Usted ha leído y entendido la presente forma de consentimiento.
2. Usted está de acuerdo en participar en este estudio de investigación.
3. Al firmar abajo usted recibirá una copia de esta carta.

Nombre y firma de la paciente / fecha/ hora

---

Nombre y firma del esposo / fecha/ hora

---

Nombre y firma de un testigo/fecha/hora

---

Nombre y firma del investigador responsable de la toma/fecha/hora

---

**BIBLIOGRAFÍA II**  
**PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO DE OBJETIVOS**  
**(HALOPLEX)**

## PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO DE OBJETIVOS (HALOPLEX)

### 1.- Preparación de la biblioteca genómica

La preparación de la biblioteca de DNAg, se llevó a cabo, utilizando el protocolo de enriquecimiento de objetivo personalizado de “Haloplex HS” (Agilent Technologies, USA), disponible en la página: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9931-90000.pdf>.

### 1.- Construcción de la biblioteca genómica

Las muestras que cumplieron con los estándares de calidad de Haloplex, se transfirieron a tubos de reacción de 0.2 ml y se les añadió 45 µl de agua libre de nucleasas para alcanzar una concentración final por muestra de 5 ng/ µl de DNA. Posteriormente, se prepararon 483 µl de una mezcla maestra de enzimas de restricción con BSA (Albúmina de Suero Bovino), cuya mezcla contiene 16 enzimas de restricción diferentes, con sitios de corte específicos de corte en 125, 225 y 450 pb, suficiente para la digestión de 12 muestras de DNAg.

Se distribuyeron 70 µl de la mezcla maestra en tubos de reacción de 1.5 ml (Eppendor, Hamburgo) y se mezcló cada tubo suavemente en vortex durante unos segundos. Luego con una pipeta multicanal, se distribuyeron 5 µl de la mezcla maestra de restricción en una placa con capacidad para 96 muestras, y seguido a esto, se adicionaron 5 µl de muestras de DNAg a la misma placa de reacción, para alcanzar un volumen total por pozo de 10 µl, generando así una biblioteca genómica de fragmentos de restricción.

La placa de reacción fue sellada con una película de plástico adhesiva y se mezcló brevemente en una centrifuga de placas a temperatura ambiente. Seguido a esto, la placa se colocó en un termociclador y se ejecutó un ciclo de 37°C por 30 minutos y un ciclo de 8°C de mantenimiento para asegurar la digestión enzimática de las muestras. Por último se verificó la longitud de los fragmentos de restricción a partir de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, utilizando el sistema “TapeStaion”. Para validar la reacción de digestión, se utilizaron 2 µl de las muestras

de DNA control enriquecido (ECD) que tenían incorporado una sonda producto de PCR de 800 pb con sitios de corte específicos para las enzimas de restricción, las cuales se diluyeron en 2  $\mu$ l de buffer D1000 de alta sensibilidad. También se preparó 1  $\mu$ l de una muestra DNA control enriquecido sin digerir y se diluyó en un 1  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Cada muestra se colocó en una incubadora que previamente fue calentada a 80 °C y se dejaron incubar por 5 minutos. Las nueve muestras fueron cargadas en la cinta Screen Tape D100 y se inició la ejecución de la electroforesis. Se utilizó un marcador de 1500 pb en el primer pozo. La digestión exitosa está indicada por la aparición de tres bandas predominantes entre 125 y 450 pb, mientras que la muestra no digerida presenta una banda de 800 pb y una banda de DNAg  $\geq$  a 2.5 kpb.

## **2.- Enriquecimiento de objetivos mediante hibridación de sondas de captura**

Cada fragmento de restricción del DNAg, se hibridó por complementariedad de bases con las sondas de captura personalizadas de HaloPlex-HS. Durante este paso se prepararon 910  $\mu$ l de una mezcla de hibridación para la captura de 12 muestras fragmentadas de DNAg. Se distribuyó 70  $\mu$ l de la mezcla de hibridación a tubos de 0.2 ml, que previamente fueron cargados con 80  $\mu$ l de las muestras, y se adicionaron 10  $\mu$ l de primers de indexación a cada tubo. Las muestras se resuspendieron e incubaron a 54 °C por 16 horas para llevar a cabo la reacción de hibridación. Los primers de indexación, son índices de secuencia de Illumina que permiten agrupar y secuenciar varias bibliotecas de DNAg en la misma reacción de secuenciación. Cada sonda de captura de Haloplex, incorpora en su secuencia, moléculas de biotina y códigos de barras moleculares específicos para cada sonda. Transcurrido el tiempo de hibridación, los fragmentos enriquecidos de DNA forman fragmentos circulares.

## **3.-Captura de sondas híbridas enriquecidas**

Para la captura de sondas enriquecidas, se preparó una solución de captura con perlas de estreptavidina y se añadió 40  $\mu$ l de la solución por cada 160  $\mu$ l de reacción de hibridación. Se resuspendió vigorosamente cada muestra aproximadamente 15 veces, y se incubaron a temperatura ambiente 15 minutos. Los tubos se trasladaron

a una placa magnética (Agentcourt SPRIPlate Super Magnet), para unir las perlas magnéticas de estreptovodina, con las moléculas de Biotina, formando así un complejo de interacción no covalente. Dicho complejo, induce la formación de 8 puentes de hidrógeno que une hasta 4 moléculas de biotina por perla de estreptovodina. Los fragmentos circularizados fueron ligados en los extremos 5' y 3' a partir de una mezcla maestra de ligación que contiene una "DNA ligasa".

Terminado el paso de captura, las muestras se colocaron en una centrifuga de escritorio y se transfirieron a una placa magnética para fijar el DNA y las moléculas de biotina en la parte inferior del tubo de reacción. Se desechó el sobrenadante y posteriormente se agregaron 100 µl de buffer SCC. Los tubos se transfirieron nuevamente a una placa magnética donde se removió el buffer SCC por pipeteo y luego se agregaron 25 µl de NaOH (50 mM) por tubo, con resuspensión suave. Las muestras se incubaron por un minuto a temperatura ambiente para permitir la elución del DNA enriquecido.

#### **4.-Amplificación por PCR de fragmentos enriquecidos**

Terminado el tiempo de incubación, se preparó una mezcla maestra de PCR (5X Herculase II Reaction Buffer, Herculase II Fusion DNA Polymerase 100 mM, 25 mM, de dNTPs, 25 µM de cebador 1 y 2, 2 M de ácido acético) y se almacenó en hielo. A dicha mezcla se le adicionó 20 ml del sobrenadante aclarado y se mezcló por vortex. Se colocaron los tubos en el termociclador en tiempo de 98°C por 2 minutos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 10 minutos y 8°C.

Una vez concluidos los ciclos de amplificación, cada amplicón fue purificado y recuperado utilizando perlas magnéticas "Ampure XP" (Beckman Coulter, USA), las cuales permiten la eliminación eficiente de dNTPs no incorporados, cebadores, dímeros de cebadores, sales y otros contaminantes.

Al término de este paso, cada molécula de DNA objetivo amplificada por PCR, presentó una longitud aproximada de 225 a 540 pb, con una secuencia de nucleótidos conformada por: 1) Un inserto objetivo de DNA genómico; 2) Una

secuencia índice y 3) Elementos de secuencia de extremos emparejados de Illumina.

La longitud de cada fragmento de DNA objetivo enriquecido que conforma la biblioteca, se validó mediante el sistema "TapeStation 4200", usando 2 µl de la librería enriquecida. Al finalizar este paso, el grupo de enriquecimiento está listo para usarse durante la secuenciación por química de síntesis de Illumina. Se utilizó el software "Illumina experiment manager" para seleccionar la plataforma de secuenciación MiSeq, con lectura de extremos emparejados y en ciclos de lectura de 300 pb. Antes de la ejecución de secuenciación, los índices de 8 nucleótidos de cada muestra de Haloplex, se asignaron a un índice de lectura de Illumina de 5 nucleótidos, para utilizar en la plataforma MiSeq.