



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS miRNAs 29a,  
141, Y 376c EN PLASMA DE MUJERES ASOCIADOS AL  
DIAGNÓSTICO DE PREECLAMPSIA.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MENIETA FLORES RAÚL**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. en C. HÉCTOR  
FLORES HERRERA**

**ASESOR DE TESIS:**

**Dra. RAQUEL RETANA  
UGALDE**



**México, D.F. 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se desarrolló con fondos federales destinados al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) mediante el proyecto con número de registro 212250-3210091 (otorgado al M. en C. Héctor Flores Herrera).

Al programa de becas de inicio a la investigación 2014 (PROBEI-SS) por la beca otorgada durante el periodo noviembre del 2013 a marzo del 2015.

A mi director de tesis, el M. en C. Héctor Flores Herrera por todo el tiempo, esfuerzo, consejos y enseñanzas durante el desarrollo de nuestro proyecto.

Al Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez, a la Dra. Guadalupe García López y a la Dra. Anayansí Molina Hernández del departamento de Biología Celular (INPer), por todo su tiempo, comentarios y disposición otorgados para el diseño y desarrollo de este proyecto, así como también por los recursos e infraestructura proporcionadas para el desarrollo de mis experimentos.

A mis colegas de laboratorio, la Q.B.P Paulina Fuentes Zacarías, la Dra. Katherine Hernández y la Dra. María del Consuelo Álvarez Cabrera por su valioso apoyo y tiempo dedicado a lo largo de este gran proyecto.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones y acertados comentarios para mejorar y culminar mi trabajo final.

## DEDICATORIA

**A mis padres y hermano**, ya que ellos han sido el pilar de mi vida. Que puedo decir más que... ¡gracias por todo!

**A mis amigos**, por todos sus consejos, enseñanzas, regaños... gracias amigos.

A todas aquellas personas que de una u otra manera han hecho posible que finalmente pudiera alcanzar esta meta.

---

---

## INDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	10
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 Preeclampsia (PE)	
3.1.1 Definición	11
3.1.2 Factores de Riesgo	12
3.1.3 Fisiopatología	15
3.1.4 Manifestaciones clínicas y complicaciones de la PE	20
3.1.5 Diagnóstico bioquímico de la PE	21
3.2 miRNAs	
3.2.1 Definición	22
3.2.2 Biogénesis de los miRNAs	23
3.2.3 Mecanismo de silenciamiento de miRNAs	27
3.2.4 Función de los miRNAs en el desarrollo placentario.	28
4. OBJETIVOS	31
5. HIPÓTESIS	32
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
7.1 Tipo de estudio	
7.2 Población de estudio	
7.2.1 Características de la población	

7.3	Consideraciones éticas	
7.4	Criterios de inclusión y exclusión	
7.5	Variables de estudio.	
7.6	Técnicas	
7.6.1	Obtención de la sangre	
7.6.2	Obtención del RNA total	
7.6.3	Diseño de los iniciadores RT-PCR	
7.6.4	Estandarización de las condiciones de RT-PCR de los miRNAs	
7.6.5	Síntesis del cDNA	
7.6.6	Amplificación del cDNA mediante PCR y expresión de los miRNAs por electroforesis en geles de agarosa al 4%	
7.6.7	Análisis estadístico	
8.	RESULTADOS	42
8.1	Características clínicas de las pacientes	
8.2	Evaluación de la expresión de los miRNAs	
9.	DISCUSIÓN	
10.	CONCLUSIONES	48
		53
11.	PERSPECTIVAS	54
12.	REFERENCIAS	55
13.	ANEXOS	62

---

## ABREVIATURAS

(HLA)-G	Antígeno Linfocítico Humano G
ACOG	Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGO	Proteínas Argonautas
ARN	Ácido Ribonucleico
AT <sub>1</sub> -AAS	Antianticuerpos Agonistas de AT <sub>1</sub> -AAS
BMI	Índice de Masa Corporal
CTP	Con Trabajo de Parto
Drosha	Drosha–DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
dsRBD	Dominio de Unión RNA de Doble Cadena
EVTs	Trofoblastos extravillosos
EXP5	Exportina 5
GOT	Enzima Aspartato Aminotransferasa
GPT	Enzima Alanina Aminotransferasa
HELLP	Hemólisis, Enzimas hepáticas elevadas y Trombocitopenia
HPL	Lactógeno Placentario
HSP	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
LDH	Enzima Lactato Deshidrogenasa
MID	Región de unión 5' de los miRNAs
miRISC	Complejo miRNA-RISC
miRNA	MicroRNA

MMPs	Metaloproteasas
nt	Nucleótidos
PAZ	Dominio de unión 3' de los miRNAs
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Preeclampsia
PGI2	PROSTACICLINA
PIGF	Factor de Crecimiento Placentario
PO	ÓXIDO NÍTRICO
Pol II	RNA Polimerasa II
RCIU	Restricción del Crecimiento Intrauterino
RIIIids	Dominios de RNAsa III en Tándem
RT	Retrotranscripción
sEng	Endoglina soluble
sFlt-1	Factor de Crecimiento Endotelial y Vascular-1
STP	Sin Trabajo de Parto
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Tumoral Beta
TU	Unidad Transcripcional Policistronica
TXA2	TROMBOXANO
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial y Vascular.



## 1. RESUMEN

**Introducción:** La preeclampsia (PE) es un síndrome multisistémico del embarazo, está caracterizado por la aparición de hipertensión y proteinuria, y es una de las principales causas de morbi-mortalidad materna en el mundo. Para el diagnóstico de la enfermedad, además del hallazgo de hipertensión y proteinuria se determina la concentración de enzimas hepáticas, volumen plaquetario y la concentración de creatinina sérica. Recientemente se ha propuesto un diagnóstico mediante la identificación de miRNAs en fluidos corporales. Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante que regulan a aproximadamente el 30% de los genes en el ser humano. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los miRNAs 29a, 141 y 376c en plasma de mujeres con diagnóstico de PE.

**Metodología:** Se obtuvieron 90 muestras de plasma de mujeres con las siguientes características clínicas: 1) preeclampsia (PE) (n=40); 2) sin trabajo de parto activo (STP; n=30); y 3) con trabajo de parto activo (CTP; n=20). Las muestras de sangre fueron recolectadas a través de punción venosa en tubos Vacutainer con EDTA. Posteriormente, a través de centrifugación se separó el plasma, y se extrajo el RNA total con la técnica del TRizol. Para la obtención del cDNA se realizó la técnica de retrotranscriptasa reversa (RT) y posteriormente se amplificó por PCR con iniciadores específicos. La expresión de los miRNAs fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa al 4%. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada una de las bandas de los geles de agarosa, y se realizó su corrección mediante la amplificación del miRNA constitutivo 223. Los resultados obtenidos son mostrados como la media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de *t*-student con una diferencia significativa de  $p \leq 0.05$ .

**Resultados:** La expresión del miRNA-141, -376c y 29a en el grupo de PE aumentaron significativamente 1.6 ( $p \leq 0.001$ ) y 1.15 ( $p = 0.021$ ) y 1.2 veces ( $p = 0.022$ ) respectivamente comparado con el grupo STP.

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que de realizarse más pruebas y aumentar el número de muestras: 1) Los miRNA-141, -376c y 29a podrían ser utilizados como biomarcadores de la PE.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los trastornos hipertensivos son las complicaciones más frecuentes durante la gestación afectando entre el 6 al 10% del total de los nacimientos en el mundo, siendo la preeclampsia (PE) la causa más importante de morbi-mortalidad materna y perinatal. La prevalencia de la enfermedad permanece constante y afecta hasta el 10% de los embarazos en el mundo.

La PE es un síndrome multisistémico exclusivo del ser humano caracterizado por la aparición de hipertensión y proteinuria el cual aparece después de la semana 20 de la gestación. Es responsable de complicaciones neonatales como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), nacimientos pretérmino, muerte perinatal, y afecciones cardiovasculares asociadas a un bajo peso al nacer. Se ha demostrado que la disfunción placentaria es la principal responsable del desarrollo de la PE, ya que su remoción elimina todos los síntomas, pero no obstante a pesar de numerosas investigaciones, los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad permanecen poco comprendidos. Actualmente el diagnóstico de la enfermedad no es específico y es imposible realizarlo en etapas tempranas, por lo que su detección ocurre tardíamente poniendo en peligro la salud de la madre y el feto.

Los miRNAs son moléculas de RNA pequeños monocatenarias de una longitud aproximada de 22 nucleótidos, los cuales median la expresión de los genes a nivel post-transcripcional. Recientemente se han identificado miRNAs en suero y plasma sanguíneo, y se ha sugerido que pueden ser una novedosa herramienta del diagnóstico de diversas enfermedades tales como el cáncer, enfermedades renales, cardiovasculares, autoinmunes e inflamatorias, y desordenes durante el embarazo. En humanos se estima que una tercera parte de los genes son regulados por miRNAs, y además participan en una gran parte de los procesos celulares y durante la respuesta inflamatoria. En el presente trabajo identificamos cuatro miRNAs asociados al desarrollo de PE en plasma de mujeres, los cuales podrían ser usados como biomarcadores específicos de la enfermedad.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Preeclampsia

##### 3.1.1. Definición.

En México, la preeclampsia junto con la eclampsia, representan las principales causas de defunciones maternas.<sup>1, 2</sup> De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) existe una mayor morbilidad en mujeres de 20 a 24 años.<sup>3</sup> En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), se ha estimado que en los últimos cinco años hasta el 8.0% del total de los embarazos que son atendidos en la clínica desarrollan PE.<sup>4</sup>

Actualmente, la ACOG (Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología) señala que los desórdenes hipertensivos durante el embarazo se clasifican en cuatro categorías: 1) PE-eclampsia (PE leve y severa); 2) hipertensión crónica, la cual es aquella que precede al embarazo; 3) hipertensión crónica con preeclampsia super-impuesta, que se caracteriza por la presencia de hipertensión arterial en asociación con el desarrollo de PE; e 4) hipertensión gestacional, la cual se desarrolla después de la semana 20 de gestación y se caracteriza por el aumento de la presión arterial, sin la manifestación de otros signos sistémicos como los ocurren durante la PE.<sup>7</sup>

La PE está definida como el aumento en la presión arterial sistólica ( $\geq 140$  mmHg) y diastólica ( $\geq 90$  mmHg) acompañada de proteinuria ( $\geq 300$  mg en 24 h), y cefalea. Las evidencias clínicas inician después de la semana 20 de gestación.<sup>6</sup> Algunas mujeres con PE pueden desarrollar el síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia), que es una enfermedad multisistémica caracterizada por la presencia de anemia hemolítica, elevación de las enzimas hepáticas y la aparición de trombocitopenia, y eclampsia, la cual es una complicación de la PE en la que

aparecen episodios de convulsión y/o coma, y ambas constituyen las complicaciones más graves de la enfermedad.<sup>6-8, 9</sup>

### 3.1.2. Factores de riesgo para el desarrollo de la preeclampsia

A pesar de que no se conocen las causas exactas de la PE, se han identificado diversos factores de riesgo que pueden predisponer a su desarrollo entre los que destacan las edades maternas extremas, mujeres primigestas, gestación multifetal, diabetes mellitus gestacional, enfermedades renales, hipertensión crónica, trombofilia, obesidad y antecedentes familiares.<sup>10, 11</sup> En el cuadro 1 se muestra una recopilación de los factores de riesgo en la PE evaluados en diferentes estudios.

Las condiciones ambientales también pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad, ya que las mujeres que viven a mayores altitudes son más propensas a padecer PE.<sup>9</sup> Además en diversos estudios se ha demostrado que las mujeres de clase baja y que viven en países en vías de desarrollo, generalmente son más propensas al desarrollo de la enfermedad, esto debido posiblemente a la falta de adecuadas atenciones médicas durante el embarazo y hábitos nutricionales.<sup>12</sup> En nuestro país de acuerdo con el estudio de Cerón et al. (2001), las mujeres con un estatus económico bajo tienen el doble de riesgo de desarrollar PE.<sup>13</sup>

Se ha puesto de manifiesto que algunos factores genéticos pueden estar involucrados en el desarrollo de la PE. Existe una relación entre la PE y los polimorfismos en los genes que controlan la presión sanguínea, la coagulación, y el metabolismo de los radicales libres como la renina, la angiotensina y el óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) (cuadro 2).<sup>20, 22</sup> De igual forma, se ha reportado que la modificación de las histonas, las alteraciones epigenéticas y otras mutaciones en los genes que controlan

procesos del desarrollo placentario pueden estar implicados en el desarrollo de la PE. <sup>22, 23</sup>

**Cuadro 1. Principales factores de riesgo evaluados en distintos estudios**

<b>Estudio</b>	<b>Tamaño de la población estudiada</b>	<b>Factores de riesgo más significativos</b>
<b>Kumar et al. (14)</b>	200	Hipertensión, diabetes, historial familiar con hipertensión y PE
<b>Laminape et al (15)</b>	15,437	Edades maternas avanzadas, hipertensión y diabetes
<b>Kisten Duckit et al. (16)</b>	Revisión sistemática	Embarazos anteriores con PE, diabetes, embarazos gemelares, edades maternas avanzadas y antecedentes familiares con hipertensión.
<b>Conde et al. (17)</b>	45,530	Nuliparidad, múltiples embarazos, hipertensión y diabetes
<b>Mesviel et al. (18)</b>	108	Primer embarazo, diabetes, diabetes, hipertensión, historial familiar con PE e hipertensión.
<b>Dejener et al. (19)</b>	3,365	Edades maternas extremas
<b>Mireles et al. (14)</b>	131	Primiparas
<b>Ramesh et al. (13)</b>	300	Mujeres con bajos ingresos, antecedentes de PE, historial familiar con PE, hipertensión y diabetes.

De acuerdo con diferentes estudios sobre los factores de riesgo en la PE, la hipertensión anterior a la PE, diabetes, edades maternas extremas y los antecedentes familiares de PE e hipertensión, representan los factores más significativos para su desarrollo. Modificado de Ramesh K. et al, 2014.<sup>13</sup>

**Cuadro 2. Polimorfismos asociados al desarrollo de la PE.**

<b>Mecanismo fisiopatológico</b>	<b>Gen afectado</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Polimorfismo predominante investigado</b>
<b>Trombofilia</b>	Factor V Leiden	F5	506Gln>Arg
	Metilentetrahidrofolato	MTHFR	C667T
	Protrombina	F2	G20210A
	Factor 1 del plasminógeno	SERPINE1	I/D promoter
	Integrina glicoproteína IIIa	GPIIIA	C98T
<b>Función endotelial</b>	Óxido nítrico sintetasa endotelial 3	Enos3	298Glu>Asp
	Receptor del factor de crecimiento endotelial y vascular 1	VEGFR1	TG repeat
	Factor de crecimiento endotelial y vascular	VEGF	C936T
<b>Proteínas vasoactivas</b>	Angiotensinógeno	AGT	235Met>Thr
	Enzima convertidora de angiotensina	ACE	I/D intron 16
<b>Metabolismo lipídico y estrés oxidativo</b>	Apolipoproteína E	APOE	C866T
	Epóxido hidrolasa microsomal	EPHX	113Tyr>His
	Glutation S-transferasa	GST	A313G
<b>Inmunológico</b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$	TNF	G-308A
	Interleucina 10	IL-10	G1082A

Se han identificado más de 70 genes involucrados en diversos eventos fisiopatológicos durante la PE, los cuales han sido implicados en el desarrollo de la enfermedad. Tomado de Haram K. 2009.<sup>13</sup>

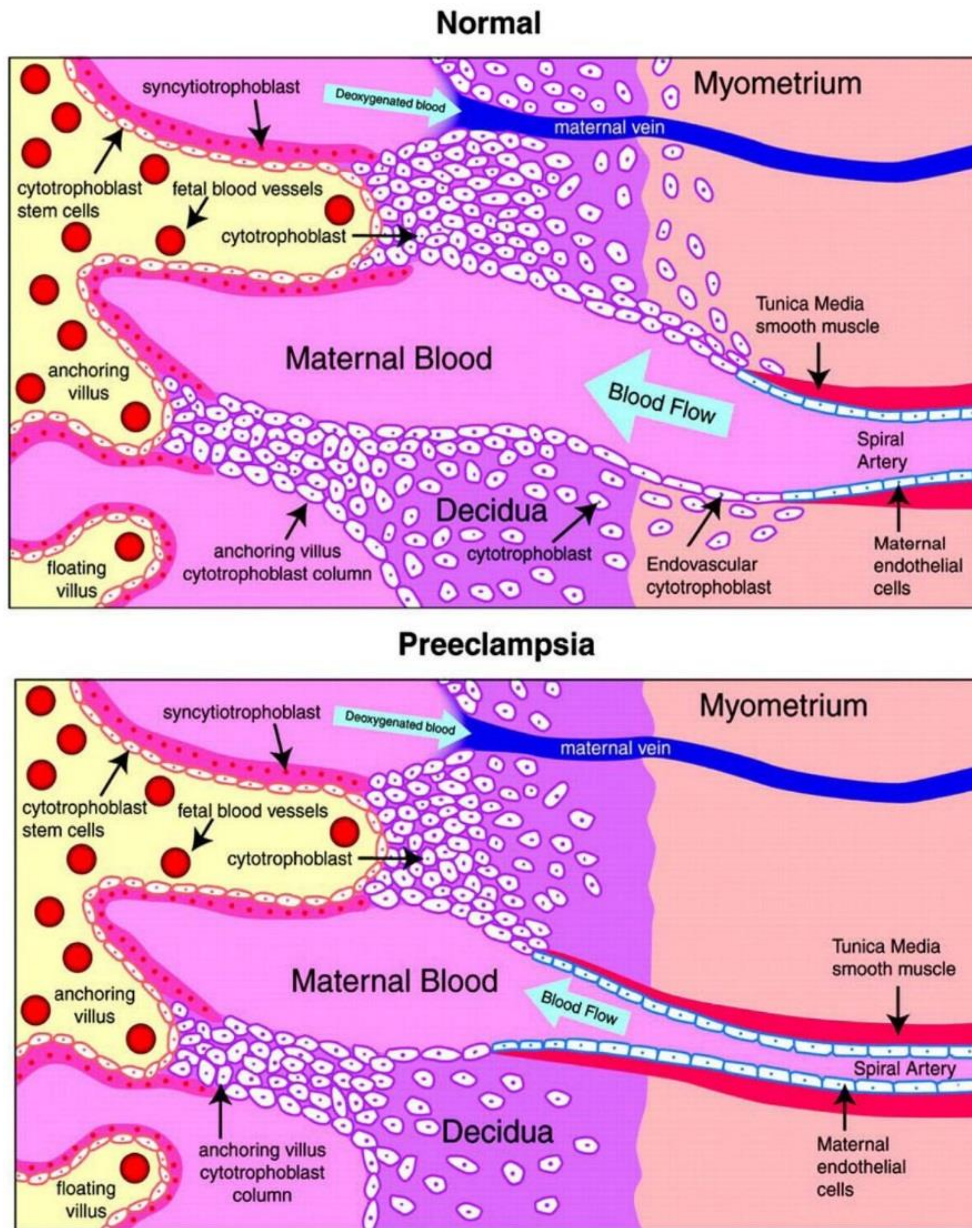
### 3.1.3 Mecanismo etiopatogénico de la PE.

La reducción de la perfusión uteroplacentaria y una implantación deficiente son los principales factores que propician el desarrollo de la PE.<sup>24, 25</sup> En condiciones normales, los citotrofbastos se diferencian en subpoblaciones que participan en el desarrollo y crecimiento del feto. En una primera etapa, los citotrofbastos se transforman en células trofoblásticas villosas y extravilosas. A través de la vía villosa, los citotrofbastos forman una capa externa de sincitiotrofbastos que se encargan de revestir a la placenta, y posteriormente, entran en contacto directo con la sangre materna para realizar el intercambio materno-fetal de nutrientes y sustancias esenciales para el desarrollo del feto. A partir del día 14 de implantación, los citotrofbastos rompen la capa externa de sincitiotrofbastos diferenciándose a través de la vía extravilosa en trofbastos extravilosos, que invaden el estroma uterino para modificar a las arterial espirales en vasos de gran calibre. Los trofbastos extravilosos se diferencia en dos subpoblaciones: los trofbastos intersticiales y vasculares. Los trofbastos intersticiales penetran en la decidua y el miometrio adyacente, y después se segregan alrededor de las arterias espirales, encargándose de preparar a los vasos para la invasión de los trofbastos vasculares. Posteriormente, los trofbastos vasculares penetran las arterias y comienzan la destrucción del endotelio a través de un mecanismo de apoptosis, y finalmente sustituyen al tejido conjuntivo y muscular de las arterias. La maduración endometrial se relaciona con el crecimiento de las arterias espirales, ramas de las arterias uterinas que luego transportarán la sangre materna a los espacios intervillosos de la placenta, y su crecimiento y estructura depende de las secreciones hormonales ováricas y placentarias.<sup>26-28</sup> Esta proliferación endotelial continúa durante la fase lútea y las primeras semanas de gestación.<sup>20</sup>

Actualmente, se piensa que la reducción de la perfusión uteroplacentaria es el factor de inicio de la PE, esto como resultado de la invasión anormal de las arteriolas espirales por los trofbastos vasculares, los cuales no invaden



adecuadamente a las arteriales espirales (figura 1).<sup>20, 24</sup> Las placentas de mujeres con PE expresan menores niveles de metaloproteasa de la matriz (MMP)-9, antígeno linfocítico humano (HLA)-G, lactógeno placentario (HPL) y a1b1, que aquellas mujeres con embarazos normales; los niveles de integrina a4b5 se mantienen estables y la a1b1 aumenta. Además, no ocurre el cambio de cadherina E a cadherina VE, ni se producen VCAM-1 y PECAM-1. Estos fenómenos testifican que los citotrofoblastos han perdido su capacidad de invasión profunda, y esto se expresa por la persistencia de vasoconstricción uterina. El ingreso de sangre a los espacios intervillosos es menor, y por lo tanto, la consecuencia es la hipoxia, con aumento de la peroxidación lipídica y de la relación tromboxano A2/prostaciclina (TXA2/PGI2), lo cual acentúa la vasoconstricción y la agregación de plaquetas. Frecuentemente, se encuentra trombosis y depósitos de fibrina diseminados en la placenta, en esta enfermedad. Además, la hipoxia aumenta la producción de endotelina (ET)-1 y disminuye la de óxido nítrico (NO).<sup>24, 29</sup>

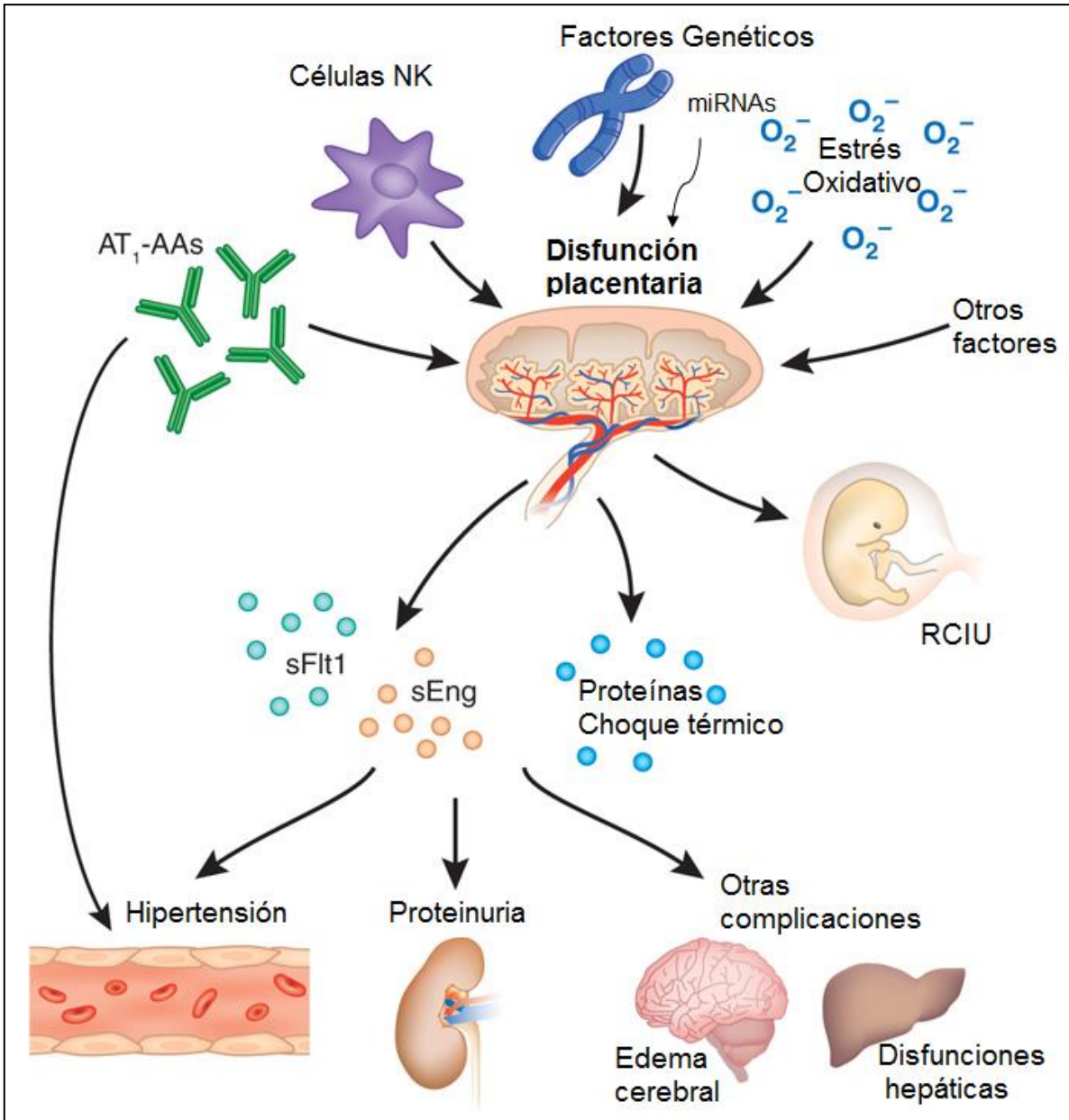


**Figura 1. Remodelación de las arterias espirales durante el embarazo normal y el desarrollo de PE.** A) Placentación normal. Los citotrofoblastos endovasculares remodelan a las arterias espirales mediante el reemplazo de las células endoteliales y del músculo liso, y las transforman de pequeños vasos dilatados a arterias de gran calibre y alta resistencia. B) Desarrollo de PE. Los citotrofoblastos invaden la decidua de manera superficial y la pseudovasculogénesis se lleva a cabo de manera irregular, por lo que no hay remodelación de las arterias espirales. Tomado de Kim Y, 2013.<sup>45</sup>

Por otro lado, los desórdenes placentarios también producen la liberación de factores antiangiogénicos que son liberados por la placenta a la circulación sanguínea, y que son responsables de la disfunción endotelial sistémica y la inhibición de factores proangiogénicos.<sup>20, 30-32</sup> Algunos de estos factores son la endoglina soluble (sEng), el factor de crecimiento vascular-endotelial 1 (sFlt-1), la endotelina-1, la fibronectina, el factor de von Willebran, la trombomodulina y las citosinas inflamatorias. La proteína antiangiogénica sFlt-1 actúa como antagonista de los factores de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) y de crecimiento placentario (PlGF), por lo que se inhibe su actividad biológica (la formación de del tejido endotelial y su efecto vasodilatatorio).<sup>30</sup> La endoglina es un co-receptor celular para el factor de crecimiento tumoral-beta (TGF- $\beta$ ), el cual se encuentra en trofoblastos y células endoteliales. Se encarga de promover la angiogénesis, la diferenciación endotelial y regulación del óxido nítrico sintetasa. En mujeres con PE se encuentra sobre expresada, y la forma soluble de la endoglina (sEng) también llamada CD105, es liberada a la circulación sanguínea. A diferencia de la endoglina no soluble, es un factor antiangiogénico que restringe la formación del tejido endotelial y formación de capilares al unirse a moléculas de TGF- $\beta$  e impidiendo que su unión a los receptores de membrana de endoglina.<sup>31, 32</sup>

Recientemente en nuestro grupo de investigación, hemos demostrado que las proteínas de choque térmico (HSP 60 y 70) son secretadas a la circulación materna durante el desarrollo de la PE. Las HSP son responsables de la inflamación sistémica, estrés oxidativo y daño hepático en mujeres con PE.

Finalmente, la hipoxia crónica puede inducir la transcripción de algunos genes, como el de ET-1 (vasoconstrictor), de la enzima convertidora de angiotensina (hipertensora), del activador del plasminógeno (que estimula la formación de TGF- $\beta$  activa, que inhibe la invasión de CTEV) y de la ciclooxigenasa-1 (COX-1, una enzima comprometida en la producción de prostaglandinas).<sup>23</sup>



**Figura 2. Mediadores bioquímicos liberados por la placenta disfuncional.** Diversos factores como la acción de los anticuerpos agonistas AT<sub>1</sub>-AAs, factores genéticos, el estrés oxidativo y otros factores pueden producir una disfunción placentaria, lo que a su vez genera la liberación de factores antiangiogénicos y otros mediadores inflamatorios como parte del desarrollo de la PE. Modificado de Parikh S, 2008.

### 3.1.4. Manifestaciones clínicas y complicaciones de la PE

#### Hipertensión y complicaciones cardiovasculares.

La hipertensión es la manifestación más común en la PE. El incremento de la resistencia vascular periférica en lugar de un incremento del gasto cardiaco es la causa de la hipertensión. La hiperuricemia, y la respuesta anormal a la angiotensina II y a las catecolaminas también contribuyen al daño vascular y a la aparición de la hipertensión. La PE puede conducir a un daño vascular permanente y además puede elevar el riesgo del desarrollo de enfermedades cardiovasculares.<sup>34</sup> Existe una asociación entre el desarrollo del síndrome metabólico en mujeres que padecieron previamente PE. Además se ha reportado que las personas que nacieron con embarazos con desarrollo de PE, tienen un mayor riesgo de padecer afecciones cardiovasculares en la edad adulta, tales como los accidentes cerebrovasculares isquémicos.<sup>36-37</sup>

#### Daños neurológicos.

Si la PE no es tratada y se complica, puede desarrollarse la eclampsia. Los dolores de cabeza, visión borrosa y la pérdida temporal de la visión son algunas de las manifestaciones de la eclampsia. Por otro lado, durante la PE, algunos cambios neurológicos como el edema y la vasoconstricción cerebral pueden ocurrir como parte de las manifestaciones patológicas.<sup>35</sup>

#### Daños renales.

Los riñones son los órganos con mayor afección durante la PE, y la proteinuria es la manifestación visible del daño. Los niveles altos de proteinuria pueden ser índices de un pobre pronóstico de recuperación, así como también de un mayor riesgo de desencadenar eclampsia o síndrome de HELLP. Hay un riesgo de un incremento persistente de microalbuminuria después de la PE, la cual es un marcador de daño endotelial renal como resultado de un daño sistémico vascular, y está podría ser la causa del daño renal después de la PE.<sup>10, 38</sup>

### 3.1.5. Diagnóstico bioquímico y tratamiento de la PE

A pesar de que la determinación de la presión arterial y la proteinuria son las principales pruebas que se realizan para el diagnóstico de la PE, existen otros marcadores bioquímicos que pueden indicar la gravedad de la enfermedad y su grado de afectación sistémica.

**Cuadro 3. Parámetros clínicos para el diagnóstico de la PE leve y severa.**

Parámetro	Valores normales	PE Leve	PE severa
<b>Presión arterial</b>	120/80 mmHg	≥ 140/90 mmHg	≥ 160/110 mmHg
<b>Proteinuria</b>	< 80 mg/ 24 h	≥ 300 mg/ 24 h	≥ 5 g/ 24 h
<b>Conteo plaquetario</b>	1.5-4.5 X 10 <sup>4</sup>	< 1X10 <sup>5</sup> /μL	< 1X10 <sup>5</sup> /μL
<b>Enzimas hepáticas</b>	LDH: 105-330 UI/L GOT: 10-40 UI/L GPT: 7-40 UI/L	Aumento de dos veces con respecto a los valores normales	Aumento de dos veces con respecto a los valores normales
<b>Creatinina sérica</b>	0.7-1.2 mg/dL	> 2 mg/ dL	> 2 mg/ dL

Tomado de ACOG 2013. Se muestran las pruebas clínicas utilizadas para diagnosticar la PE leve y severa. Actualmente la ACOG señala que la presencia de proteinuria no es determinante para el diagnóstico de la PE.

La PE leve se diagnóstica al encontrar hipertensión arterial ≥ 140/90 mmHg en dos ocasiones en un rango de 4 horas después de la semana 20 de gestación, y en mujeres sin hipertensión previa al embarazo, mientras que en la PE severa la presión arterial es ≥ 160/110 mmHg. También existe proteinuria ≥ 300 mg en 24 h de recolección de orina, sin embargo cuando no es posible la cuantificación, esta puede ser determinada a través de tiras reactivas para orina, siendo un resultado positivo +1 para la determinación de proteínas. No obstante, el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG, por sus siglas en inglés) en su último informe emitido en noviembre del 2013 propuso que la detección de altos niveles de proteinuria no era necesaria, lo anterior debido a que algunas pacientes con PE no

presentan concentraciones elevadas de proteínas que sugieran la existencia de PE.<sup>5-7</sup>

Por lo tanto, en ausencia de proteinuria la PE se diagnostica por la aparición de hipertensión asociado con trombocitopenia ( $< 100,000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ), función hepática alterada (niveles elevados de transaminasas en sangre), el desarrollo de insuficiencia renal (niveles de creatinina en suero mayores a  $1.1$  mg/dL), edema pulmonar y la aparición de trastornos cerebrales y visuales.<sup>7</sup>

A pesar de que el tratamiento antihipertensivo en mujeres con PE no modifica la historia natural de la enfermedad, puede ser utilizada para disminuir la incidencia de hipertensión severa, así como también para mantener la presión diastólica entre  $80$  y  $105$  mmHg y sistólica entre  $130$  a  $155$  mmHg. Para poder realizar el tratamiento adecuado, debe realizarse para un protocolo de seguimiento estrecho con mediciones de presión arterial y exámenes de laboratorio. El tratamiento farmacológico y su vía de administración dependerá de la experiencia de su prescripción, costos y disponibilidad, y puede iniciarse con los siguientes fármacos: alfametildopa (el medicamento de primera línea en PE e hipertensión de cualquier tipo asociada al embarazo), labetalol, betabloqueadores (acebutolol, metoprolol, pindolol, propanolol) y antagonista del calcio (nifedipina y cardipina).<sup>2, 7</sup>

## 3.2. microRNAS (miRNAs)

### 3.2.1. Definición.

En las últimas décadas, uno de los principales descubrimientos en el área de la biología molecular ha sido el de los miRNAs los cuales se encargan de la regulación génica en organismos eucariontes. Los miRNAs son RNA pequeños no codificantes de 18 a 24 nucleótidos de longitud y son generados a partir de un transcrito endógeno con estructura de horquilla. El primer miRNA llamado *lin-4* fue identificado en *Caenorhabditis elegans* en 1993. El desarrollo actual de tecnologías de secuenciamiento genético y métodos de predicción computacionales han permitido el descubrimiento de un gran número de miRNAs, y actualmente existen más de 800 secuencias registradas para *Homo sapiens* en la base de datos de miRNAs que almacena secuencias para diferentes especies (disponible en <http://microrna.sanger.ac.uk>). Muchos de los miRNAs en animales bilaterales (simetría bilateral) se encuentran altamente conservados (55% de los miRNAs de *C. elegans* tienen homólogos con los humanos), lo que sugiere que los miRNAs se encuentren implicados en el proceso evolutivo.<sup>41-44</sup>

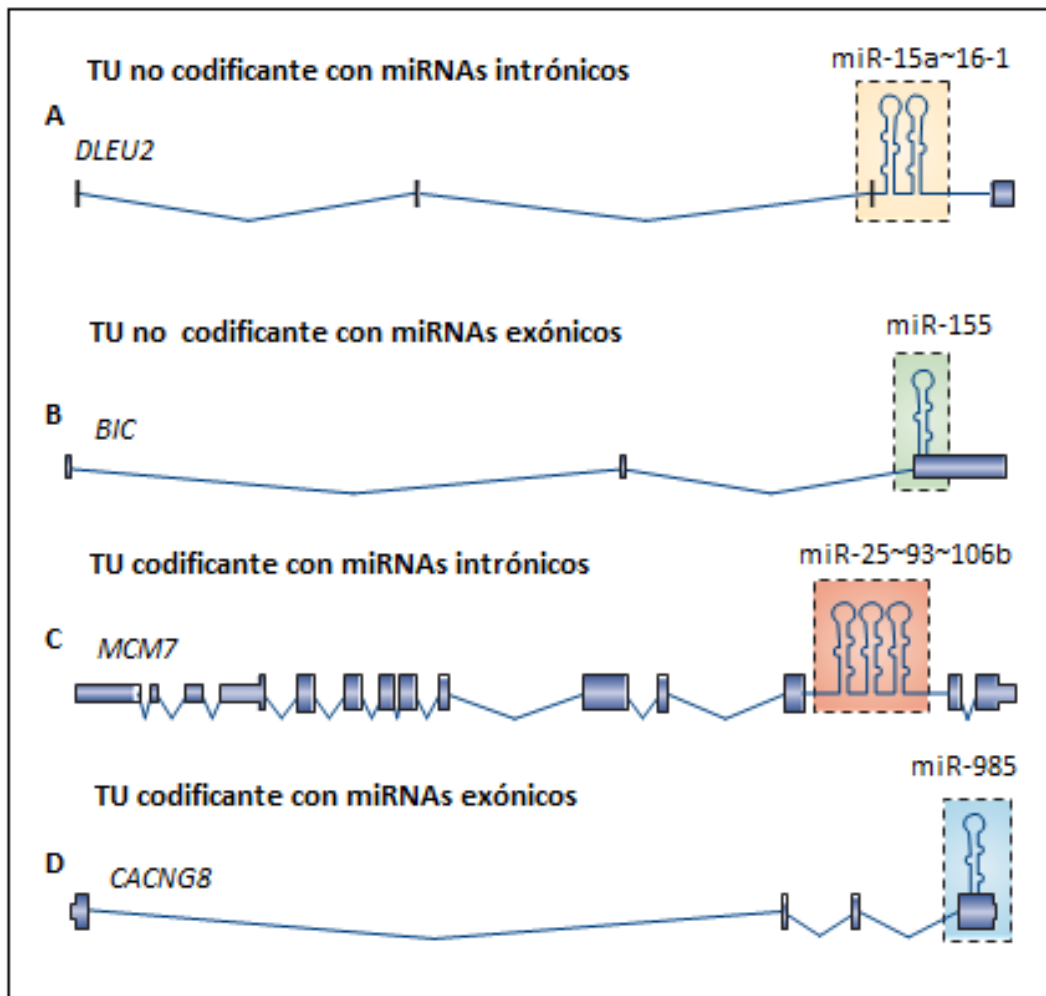
En los seres humanos, cerca de una tercera parte de los genes son regulados por miRNAs. Los miRNAs controlan la expresión de genes específicos mediante la represión del RNA mensajero, ya sea por desestabilización del transcrito, inhibición transcripcional o ambas, sin embargo recientes investigaciones han demostrado que también pueden unirse a otras regiones como los exones codificadores de proteínas. También se encuentran involucrados en muchos procesos biológicos como el desarrollo, funciones celulares y control metabólico.<sup>42</sup> Se ha demostrado que los miRNAs se encuentran asociados y participan activamente en numerosas patologías, incluyendo diferentes tipos de cáncer y patologías asociadas al embarazo. Además se han identificado concentraciones de miRNAs en el suero y plasma sanguíneo con altas correlaciones respecto a los tejidos donde son producidos.<sup>44, 46</sup>



### 3.2.2. Biogénesis de los miRNAs

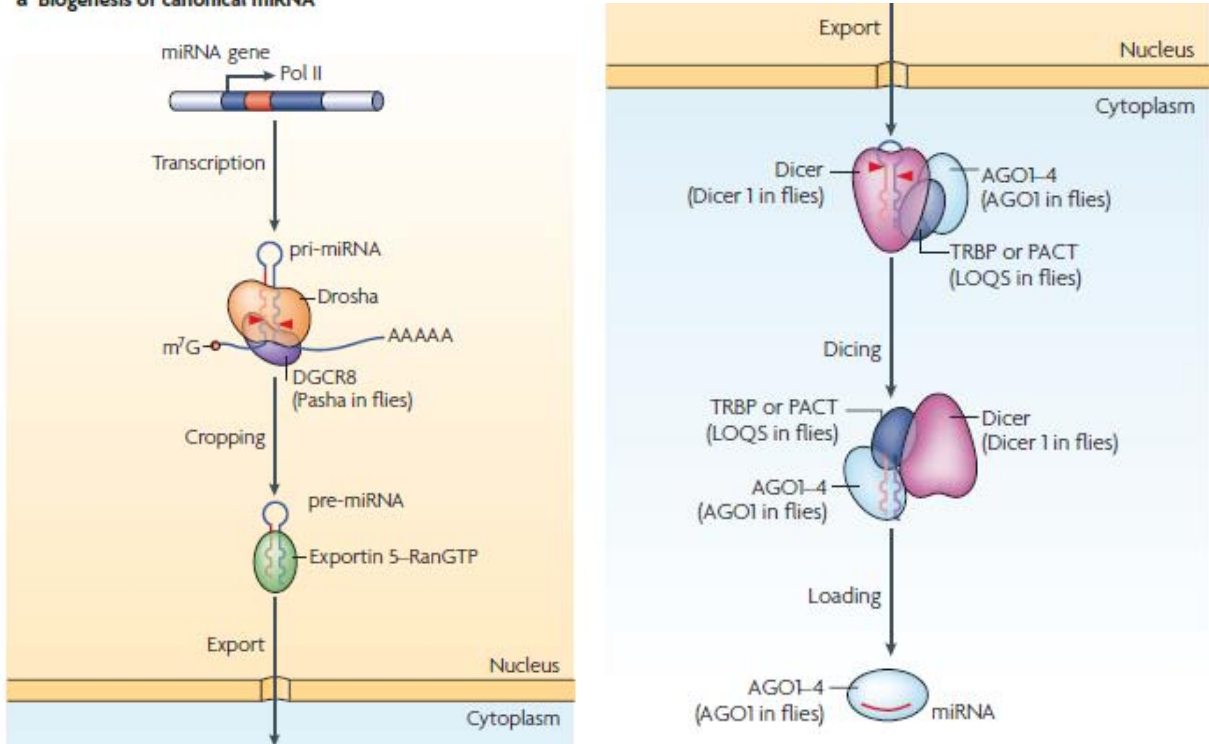
La gran parte de las secuencias que codifican para miRNAs se encuentran en clusters, los cuales son transcritos desde una unidad transcripcional policistrónica (TU). Generalmente se localizan en regiones intrónicas de transcritos no codificantes y regiones exónicas de TUs no codificantes (Figura 3). La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo, y su transcripción está mediada por una RNAsa II o también llamada RNA polimerasa II (Poll), la cual genera transcritos primarios (pri-mirnas) que tienen una estructura en forma de horquilla compuesta por un tallo y un bucle.<sup>47</sup>

Posteriormente, el miRNA inmaduro es procesado por una RNAsa III llamada Drosha la cual escinde al pequeño RNA y genera una estructura de horquilla. Para llevar a cabo la maduración del miRNA, Drosha requiere de la proteína DGCR8 (DiGeorge syndrome critical región gene 8) y forman un complejo llamado Microprocesador como se muestra en la figura 4. La RNAsa III (Drosha) a través de su dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD) reconoce al sustrato, y mediante sus dominios de RNAsa III en tándem (RIIIds a-b) escinden y procesan al pri-miRNA para formar un pre-miRNA. Posteriormente, la exportina 5 (EXP5) junto con el cofactor RAN transportan los pre-miRNA del núcleo al citoplasma. En el citoplasma, otra RNA III (Dicer) procesa al pre-miRNA. Dicer se une a través del dominio PAZ a la base de la horquilla del pre-miRNA, y el dominio de unión a RNA de doble cadena a la base de la burbuja, y genera RNA dúplex de aproximadamente 22 pb, los cuales contienen extremos romos en 3'. Cuando Dicer ha generado a la molécula de miRNA madura este permanece unido y posteriormente es liberado por una helicasa.<sup>47, 48</sup>



**Figura 3. Localización genómica de los miRNAs de acuerdo a las regiones codificantes y no codificantes.** De acuerdo a su localización genómica relativa a los exones e intrones, los miRNAs se pueden subdividir en 4 categorías: A) miRNAs intrónicos en TU no codificantes, como es el caso del clúster miR-15a~16-1. B) miRNAs exónicos en TU con codificantes. C) miRNAs intrónicos en transcritos que codifican para proteínas. Se muestra al clúster miR-25~93~106b el cual se encuentra insertado en el transcrito MCM7. D) miRNAs exónicos en transcritos codificantes de proteínas. Las estructuras de horquilla representan a la estructura inmadura del miRNA. Los rectángulos azules representan a las regiones codificantes de proteínas. Modificado de Kim-Han 2009.<sup>42</sup>

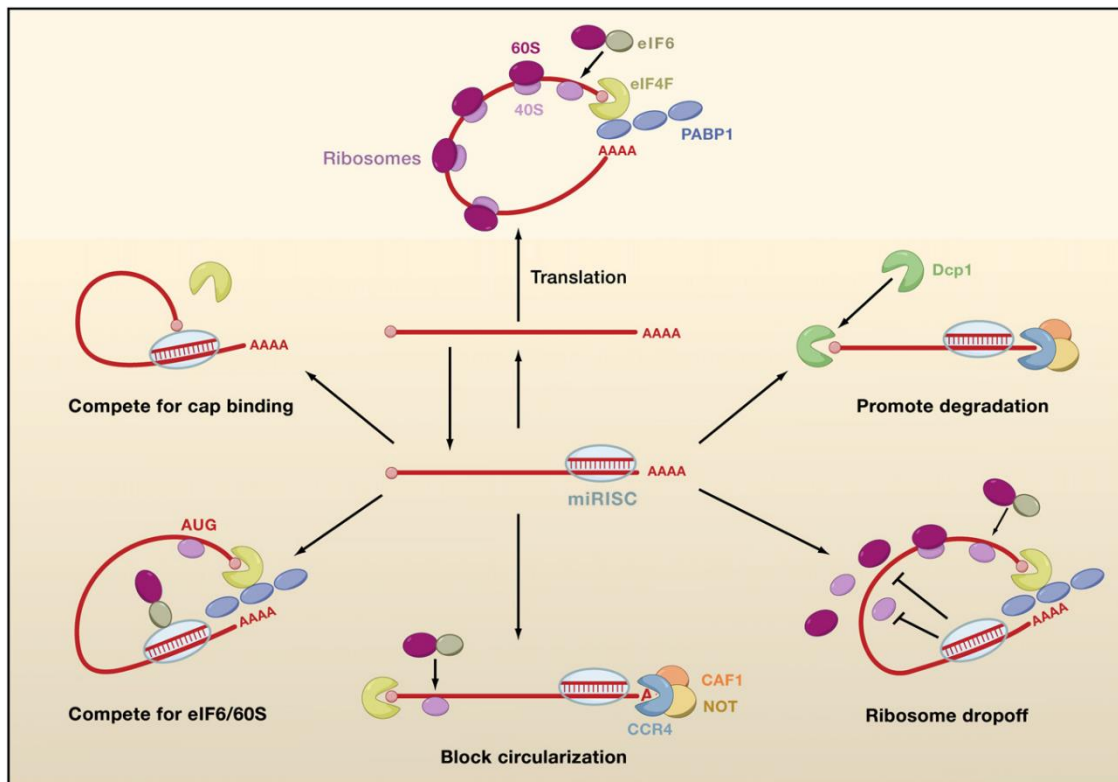
**a Biogenesis of canonical miRNA**



**Figura 4. Biogénesis de los miRNAs a través de la vía canónica.** La síntesis de los miRNAs inicia en el núcleo celular con su transcripción por la RNA polimerasa II (Pol II), la cual genera un transcrito primario (pri-miRNAs). Posteriormente el complejo Drosha genera pre-miRNAs de aproximadamente 65 nt de longitud. Los pre-miRNAs son reconocidos por la EXP5 la cual junto con el cofactor RanGTP los transportan al citoplasma. En un tercer paso la RNAasa III Dicer genera miRNAs de doble cadena. Las proteínas argonautas (AGO) median el procesamiento del pre-miRNA y su ensamblaje en complejo RISC. Una cadena permanece unida a las proteínas AGO, mientras que la otra es responsable del mecanismo de silenciamiento transcripcional. Modificado de Kim H, 2009.<sup>42</sup>

### 3.2.3. Mecanismo de silenciamiento de los miRNAs

La principal función de los miRNAs es la de silenciar la traducción de los mRNA blancos. Los miRNAs se unen al mRNA blanco a través de la región no codificante 3'-UTR, en cual pueden unirse un gran número de miRNAs actuando de forma cooperativa. De esta forma se ha postulado que un gran número de miRNAs puede actuar sobre el mismo mRNA blanco.<sup>48, 49</sup>



**Figura 5. Mecanismos de represión génica mediadas por miRISC (Complejo miRNA-RISC).** Tomado de Carthew R, 2009.<sup>49</sup>

Posteriormente a la digestión del miRNA por Dicer, se lleva a cabo la incorporación del miRNA al complejo RISC o al complejo RITS, los cuales digieren al mRNA y suprimen la traducción. El complejo RISC se compone principalmente de ribonucleoproteínas de familia de las proteínas Argonautas. Las proteínas Ago se componen de tres dominios: el dominio PAZ, MID y PIWI. El dominio PAZ y el

dominio MID se unen a los extremos 3' y 5' respectivamente del miRNA. Por otro lado, el dominio PIWI de algunas proteínas Ago puede escindir al mRNA blanco junto con el microRNA (Actividad slicer). Una de las cadenas del miRNA maduro (guía), es la que actúa sobre el mRNA blanco, mientras que la otra hebra (pasajera) es generalmente degradada. La estabilidad termodinámica de cada una de las hebras determinará cual es la que se unirá al complejo RISC para silenciar al mRNA. Generalmente la hebra con terminación 5' que es menos estable con respecto a sus pares de bases es elegida como la hebra guía, mientras que la hebra que es más estable es degradada. No obstante, recientes investigaciones han descubierto que un importante número de hebras pasajeras se asocian a proteínas AGO, por lo que al igual que las hebras líderes pueden inhibir la acción del mRNA. Además, esto implica que además de la estabilidad termodinámica, existen otros procesos por los cuales es seleccionada la hebra líder.<sup>48, 49.</sup>

La manera en que interacciona el miRNA en la región 3'-UTR con su RNA blanco, determina la forma en que se llevará a cabo el silenciamiento del gen. Si existe una perfecta complementariedad del miRNA con la región 3'-UTR, el mRNA será degradado. Sin embargo, si no existe una completa asociación del miRNA y el mRNA su traducción será inhibida sin afectar la estructura de este último.<sup>49</sup>

#### 3.2.4. Funciones de los miRNAs en el desarrollo placentario.

De acuerdo con varias investigaciones, los miRNAs juegan un papel fundamental en el desarrollo placentario. A través de numerosas técnicas tales como amplificación por PCR en tiempo real, microarreglos, hibridación *in situ*, y análisis de Northern blot, un gran número de miRNAs han sido identificados en células trofoblásticas y tejido placentario, y además ha sido posible la identificación de sus precursores. Así mismo, en trofoblastos se han hallado proteínas esenciales para su biogénesis y mecanismo de acción tales como Drosha, EXP5, Dicer, Ago2, y entre otras.<sup>60</sup>

Las técnicas de RT-PCR son ampliamente usadas para la identificación y determinación de los niveles de expresión de miRNAs. Esta técnica permite el análisis de expresión en un gran número de tipos de muestras, tales como tejido placentario, plasma y suero sanguíneo. No obstante, existen limitaciones al analizar la expresión de miRNAs con las metodologías actuales, debido a que estos poseen tamaños muy pequeños, y sus secuencias son muy similares a los de otros miRNAs de su misma familia.<sup>60</sup>

**Cuadro 4. Funciones de los miRNAs en células trofoblásticas.**

miRNA	FUNCIÓN	GENES BLANCO
miR-210	↓ migración/invasión	EFNA3, HOXA9
	↓ metabolismo del hierro	ISCU
	↓ respiración mitocondrial	ISCU
	↓ metabolismo esteroideo	HSD17B1
miR-376c	↑ proliferación/ invasión/ migración	ALK5, ALK7
miR-378a-5p	↑ proliferación/ invasión/ migración	NODAL
miR-195	↑ invasión	ActRIIA
miR-675	↓ proliferación	NOMO-1
miR-21	↑ proliferación/ invasión	PTEN
miR-155	↓ proliferación/ migración	CCND1
miR-16	↓ proliferación	CCNE1
	↓ invasión	
	↓ angiogénesis	
miR-34a	↓ proliferación/invasión	NOTCH1, JAG1
miR-29b	↑ apoptosis	MCL1, MMP2, VEGFA, 1TGB1
	↓ invasión	
	↓ angiogénesis	

Se muestran las funciones de los miRNAs sobre trofoblastos. Los estudios fueron hechos en cultivos de trofoblastos. Las funciones investigadas hasta ahora incluyen la proliferación, la apoptosis y el metabolismo celular. También se ha demostrado que influyen en la remodelación de las arterias espirales y la vasculogénesis placentaria. Modificada de Fu G, 2013.<sup>60</sup>

Estudios recientes, han demostrado que un importante número de miRNAs se expresa de manera específica y temporal durante los diferentes estadios del embarazo. Algunos clústers se expresan de manera específica en la placenta, tales como el C19MC y el C14MC, los cuales podrían tener efectos críticos en el desarrollo placentario y embrionario. Los estudios en biopsias placentarias tomadas en diferentes estadios y en cultivos de células trofoblásticas, muestran que la expresión de algunos miRNAs varía de acuerdo a la etapa del desarrollo placentario, siendo que los miRNAs del clúster C19MC se expresan mayormente del primero al tercer trimestre, mientras que aquellos que pertenecen al C14MC disminuyen su expresión. Lo anterior sugiere que los miRNAs poseen participan de manera específica en ciertas etapas de la gestación, regulando el desarrollo placentario.<sup>58-60</sup>

El modo en que regulan el desarrollo placentario, y la forma en que estos son regulados no se encuentra completamente comprendida, debido a que es necesario realizar más estudios para comprender su naturaleza. Sin embargo, se ha comprobado que una de sus funciones principales es la regulación de la proliferación trofoblástica, apoptosis y metabolismo.<sup>67, 68</sup>

Por otro lado, los miRNAs pueden influir en la vascularización placentaria y en la remodelación de las arterias espirales por trofoblastos vasculares. El hallazgo de importantes concentraciones de la proteína Dicer en los trofoblastos extravillosos, endotelio vascular y células del músculo liso, soporta la teoría del rol potencial de los miRNAs en la vasculogénesis. De igual forma, se ha reportado que algunos factores, como VEGF el cuál promueve la formación de tejido endotelial son blancos de algunos miRNAs.<sup>57, 60</sup>

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. *Objetivo general*

- Determinar la expresión de los miRNAs 29a, 141, y 376c en plasma de mujeres con diagnóstico de PE.

### 4.2. *Objetivos particulares*

1. Extraer el RNA total plasmático de mujeres con diagnóstico de Preeclampsia (PE), con trabajo de parto (CTP) y sin trabajo de parto activo (STP) mediante el reactivo TRIzol.
2. Comparar el perfil de expresión de los miRNAs entre los tres grupos de estudio.
3. Obtener la expresión de los miRNAs analizados en los grupos de PE, STP y CTP mediante electroforesis en geles de agarosa.
4. Realizar la amplificación del cDNA obtenido mediante RT (transcripción reversa) por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo final.



## 5. HIPÓTESIS

**H1:** La expresión de los miRNAs 29a, 141, y 376c puede ser identificada en suero de mujeres con diagnóstico de PE, CTP y STP.

**H2:** La expresión de los miRNAs 29a, 141 y 376c en el suero de mujeres con PE será diferente a de las mujeres sin signos de la enfermedad.

## 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PE es la tercera causa de muertes en el mundo y está asociada a complicaciones durante el embarazo, como restricción del crecimiento intrauterino y nacimientos pretérmino, además es la causa de aproximadamente el 23% de las muertes perinatales. En México, la frecuencia de la PE ha aumentado considerablemente desde 1990, y junto con la eclampsia su incidencia oscila en aproximadamente el 8%, y del cual 1.75% corresponde a la eclampsia, 3.75% a la PE severa y 94% a la PE leve, siendo la enfermedad hipertensiva durante el embarazo que cobra más vidas. El mecanismo etiopatogénico de la enfermedad no se conoce con exactitud, pero se sabe que la placenta está completamente implicada en la enfermedad. Para realizar el diagnóstico de la enfermedad, no existen pruebas específicas y de detección temprana por lo que el diagnóstico de la enfermedad puede ser realizada de forma errónea y tardíamente.

Los miRNAs son RNAs pequeños que modulan la expresión génica y participan en gran parte de los procesos celulares. Estos participan activamente en la regulación del desarrollo placentario, y su desregulación puede propiciar la aparición de enfermedades como la PE. En estudios recientes se demostró que los miRNAs 29a, 141 y 376c se encuentran altamente expresados en placentas humanas. Además, se ha descubierto que los miRNAs se encuentran en fluidos corporales como el plasma y suero sanguíneo, por lo que en nuestro grupo de investigación nos hemos planteado las siguientes preguntas de investigación:

- **¿Es factible la obtención de miRNAs a partir de plasma sanguíneo materno?**
- **¿Los miRNAs 29a, 141 y 376c pueden ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico de la PE?**

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 7.1. Tipo de estudio

*Tipo de investigación:* Cuasi-experimental.

*Tipo de diseño:* Casos y controles.

*Características del estudio:*

- a) Por la participación del investigador: ANALÍTICO
- b) Por la temporalidad del estudio: TRANSVERSAL
- c) Por la lectura de los datos: PROLECTIVO
- d) Por el análisis de los datos: ANALÍTICO

### 7.2. Población de estudio

#### 7.2.1. Características de la población

Mujeres embarazadas que acudieron al Instituto Nacional de Perinatología para seguimiento obstétrico que de acuerdo a sus signos y síntomas fueron clasificadas en los siguientes grupos:

- a) 40 mujeres con diagnóstico de PE.
- b) 30 mujeres CTP y sin evidencias clínicas de PE.
- c) 20 mujeres STP y sin evidencias clínicas de PE.

### *7.3. Consideraciones éticas*

Previamente a la obtención de las muestras, a las pacientes que ingresan al INPer para su seguimiento obstétrico se les explica la finalidad del proyecto de investigación. Además se les menciona que la obtención de la sangre periférica (5 mL) será tomada por los médicos especialistas que colaboran con el desarrollo del proyecto, y que el procedimiento no afectará con el bienestar de ella ni de su bebé así como también no repercutirá en los costos ni con la atención médica. Finalmente, se les proporciona una carta de consentimiento informado para que la paciente firme de manera libre.

#### 7.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

**Criterios de inclusión:** Mujeres asistidas en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) que acepten participar en el estudio (previo consentimiento informado) con las siguientes características:

- a) Con evidencias clínicas de preeclampsia.
- b) Sin evidencias clínicas de preeclampsia y con trabajo de parto activo.
- c) Sin evidencias clínicas de preeclampsia y sin trabajo de parto activo.

**Criterios de exclusión:**

- a) Pacientes que estén recibiendo tratamiento contra la preeclampsia.
- b) Pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas.

**Criterios de eliminación:**

- a) Cuando la paciente decida retirarse del estudio.
- b) Cuando no se tenga completo el expediente la paciente.

#### 7.5. Variables del estudio

- a) **Variable dependiente:** Expresión de los miRNAs 29a, 141 y 376c en mujeres con diagnóstico de PE.
- b) **Variable independiente:** Desarrollo de la PE.

## 7.6. Técnicas

### 7.6.1. Obtención de las muestras

Por medio de punción venosa en tubos Vacutainer con EDTA, se obtuvo sangre periférica de mujeres embarazadas con las siguientes características: 1) sin evidencias clínicas de PE y sin trabajo de parto (STP; n=20); 2) sin evidencias clínicas de PE y con trabajo de parto (CTP; n=30); y 3) con evidencias clínicas de PE (n=40). Al momento de la toma de muestra, las pacientes no presentaron evidencias de infección u otras patologías asociadas a la respuesta inflamatoria. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm por 15 min, y a partir de la sangre centrifugada se separó el plasma, el cual fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Las características de las pacientes se muestran en el cuadro 7.<sup>46</sup>

### 7.6.2. Obtención del RNA total

A 500 mL de plasma se le adicionó el mismo volumen de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA) la mezcla fue agitada vigorosamente por 15 s y se incubaron por 15 min a 30°C. Posteriormente a cada una de las muestras se les añadió 100 mL de cloroformo (Invitrogen), se agitaron por 15 s y fueron incubadas por 5 min a 30°C. Al término las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 15 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, al cual se le agregó 550 µL de isopropanol (Invitrogen) y 1 µL de Glucógeno (Invitrogen). Posteriormente se incubaron por 1 h a -20°C. Al término de éste tiempo las muestras se centrifugaron a 4 000rpm por 30 min. Al pellet se le adicionó 1 mL de etanol al 100% y se agito vigorosamente por 15 s, y fue centrifugado nuevamente a 4000 rpm por 15 min. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. El RNA fue evaporado toda la noche a temperatura ambiente, y al día siguiente fue hidratado con 20 µL de agua libre de endonucleasas, y cuantificado por espectofotometría mediante la relación de absorbencia 260/280. Técnica Modificada.<sup>50, 51</sup>

### 7.6.3. Diseño de los Iniciadores RT-PCR.

A través de la búsqueda en la base de datos de miRNAs [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), se obtuvieron las secuencias de los miRNAs en estudio. Para cada uno de los miRNAs de estudio, se diseñaron iniciadores bucle-tallo los cuales tienen una secuencia de 50 nt (nucleótidos) constante en los miRNAs, en donde el extremo 3' determina la especificidad del miRNA. Por otro lado, el diseño de los iniciadores de PCR se realizó de tal manera que el extremo 5' tuviera la secuencia CGG CCG, lo cual aumentó la temperatura de fusión a la cadena de cDNA molde, mientras que el extremo 3' contenía la secuencia exacta del extremo 3' de cada miRNA. La secuencia del iniciador anti-sentido corresponde a 15 nt complementarios y anti-sentido del extremo 5' del iniciador de RT.<sup>50</sup>

### 7.6.4. Estandarización de las condiciones de RT-PCR de los miRNAs.

Una porción del cotiledón de una paciente STP fue macerado con TRIzol y centrifugado a 12 000 rpm por 10 minutos. La extracción y cuantificación del RNA fue realizado mediante el procedimiento antes descrito. Posteriormente, se obtuvo el cDNA a través de RT antes descrita, utilizando cada uno de los iniciadores. Las temperaturas de alineamiento para la amplificación de PCR de los miR-29a, 141, 376c se realizaron a 56, 58 y 60°C utilizando el cDNA antes obtenido. La temperatura de alineación óptima fue de 58°C para todos los iniciadores.

### 7.6.5. Síntesis del cDNA

En tubos eppendorf, se adicionaron 2.5 µL del RNA de cada una de las muestras y se calentaron a 65°C durante 15 min e inmediatamente enfriados en hielo por 5 min. Posteriormente, se adicionó 1µL de iniciadores específicos (20 pM) (Cuadro 4), 1 µL de dNTPs 10 mM (InvitroGen) y 9 µL de agua libre de endonucleasas a cada uno de los tubos, y la mezcla fue calentada a 65°C por 5 min. Finalmente, a

las muestras se les agregó 0.5 µL de enzima retrotranscriptasa (RT-PCR, cat A1250; Promega Madison WI, USA) y 4 µL de buffer 5X (RT-PCR, cat A1250; Promega Madison WI, USA) para obtener un volumen de 20 µL. La mezcla fue incubada por 60 min a 50°C y finalmente la reacción se inactivó a 70°C por 15 min. Las secuencias específicas de los iniciadores se muestran en el cuadro 5. Técnica modificada.<sup>50-52</sup>

**Cuadro 5. Secuencias específicas de los iniciadores para la RT.**

<b>miRNA</b>	<b>SECUENCIA ESPECÍFICA (5'→3')</b>
<b>29a</b>	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT AAC CG
<b>141</b>	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC CAT CT
<b>376c</b>	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CGT GG



7.6.6. Amplificación del cDNA mediante PCR y expresión de los miRNAs por electroforesis en geles de agarosa al 4%.

El cDNA obtenido fue amplificado mediante PCR. Para la amplificación de dichas secuencias se empleó la siguiente mezcla de reacción: 2.5 µL de cDNA molde, 2.5 µL de buffer 10X (Promega), 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen), 1 µL de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 1 µL cada iniciador del miRNA específico (20 pM), 0.4 µL de Taq polimerasa (Promega), y la reacción se ajustó a 25 µL con agua libre de endonucleasas. La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones en 40 ciclos: 1) desnaturalización a 95°C por 30 s; 2) alineación a 50°C por 10 s; y 3) extensión a 72°C por 20 s. La secuencia de los iniciadores se muestra en el cuadro 6.

Para obtener la expresión de los miRNAs, se realizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 4% a voltaje constante por 40 minutos, y las bandas fueron visualizadas en luz UV, y capturadas usando el sistema fotodocumentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). El perfil de las bandas de los diferentes miRNAs fueron determinadas mediante la densidad óptica utilizando el programa ImageJ (NIH; USA). Técnica modificada.<sup>50-52</sup>

**Cuadro 6. Secuencias específicas de los iniciadores de PCR.**

<b>miRNA</b>	<b>SECUENCIA ESPECÍFICA (5'→3')</b>
<b>141</b>	CGG CCG TAA CAC TGT CTG
<b>29a</b>	CGG CCG TAG CAC CAT
<b>376c</b>	CGG CCG AAC ATA GAG G
<b>Iniciador Universal</b>	GTG CAG GGT CCG AGG

#### 7.6.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se utilizó la prueba de t-Student mediante el programa (SigmaStat v3.0). Los valores son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar con una diferencias significativa de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Características clínicas de los pacientes.

En el periodo comprendido de agosto del 2013 a mayo del 2014 se tomaron un total de 90 muestras de los tres grupos de estudio (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Características clínicas de las pacientes**

Parámetro	PE (n=40)	CONTROL	
		STP (n=20)	CTP (n=30)
Edad materna (años)	29.9 ±7.3	28.3 ±8.0	22.2 ±6.3
BMI	28.86 ±6.35	25.84 ±5.58	26.3 ±5.2
Presión arterial sistólica (mm Hg)	149.9 ±15.38	106.5 ±9.8	109.8 ±12.7
Presión arterial diastólica (mm Hg)	93.14 ±9.7	67.07 ±6.6	69.2 ±8.9
Edad gestacional (semanas)	34.3 ±4.0	37.5 ±2.9	34.4 ±4.4
<i>Parámetros bioquímicos</i>			
Ácido úrico (mg/mL)	5.07 ±1.57	4.06 ±1.57	3.8 ±0.7
LDH (UI/L)	358.43 ±114.97	ND	ND
GOT (UI/mL)	23.8 ±24.1	ND	ND
GPT(UI/mL)	22.48 ±20.19	ND	ND

Los datos son mostrados como la media y la desviación estándar. LDH (enzima lactato deshidrogenasa), GOT (enzima aspartato transaminasa) y GPT (enzima alanina amino transferasa) son biomarcadores de la función hepática. BMI (Índice de masa corporal). ND (No determinado) debido a que estas pruebas bioquímicas no se realizan en pacientes sanas.

Las diferencias entre edad materna ( $p = 0.351$ ) y la concentración de creatinina ( $p = 0.289$ ) en el grupo de PE no fueron estadísticamente significativas comparada con el grupo control (Cuadro 6). El índice de masa corporal ( $p = 0.039$ ), la presión sistólica ( $p \leq 0.001$ ) y diastólica ( $p \leq 0.001$ ), y la secreción de ácido úrico ( $p = 0.020$ ) en las pacientes con PE fueron estadísticamente significativas con respecto a las pacientes sin trabajo de parto (Cuadro 6). Los parámetros bioquímicos de proteinuria urinaria a las 24-horas, LDH, GOT y GPT incrementaron únicamente en el grupo de PE (Cuadro 6). La edad gestacional de los recién nacidos fue significativamente menor en el grupo de PE con respecto a los nacimientos a término ( $p \leq 0.001$ ; Cuadro 6).

## 8.2. Evaluación de la expresión de los miRNAs.

Para determinar el cambio en la expresión de los miRNAs de los tres grupos de estudio se realizó mediante la medición de las densidades ópticas de las bandas en los geles de agarosa. La densidad óptica fue normalizada con respecto al miRNA constitutivo 233.

### a) miR-29a.

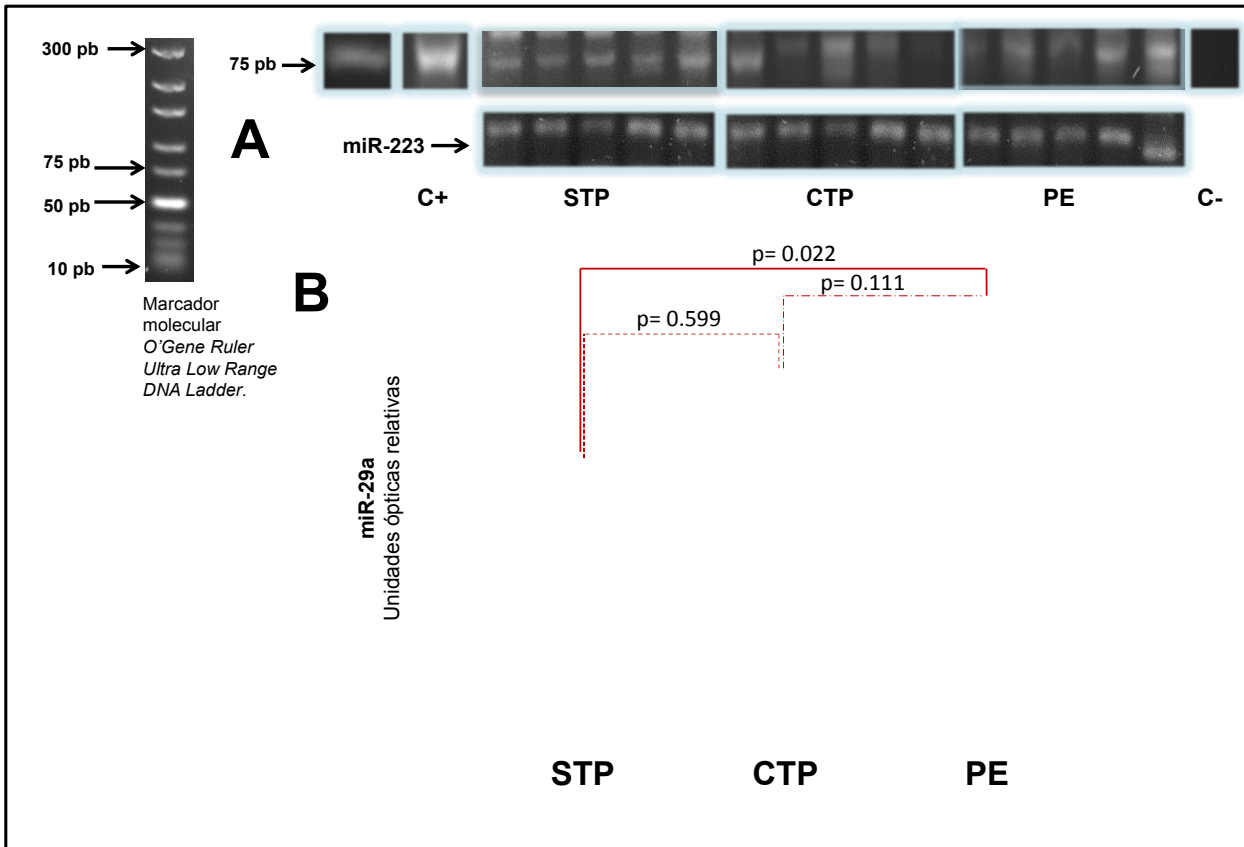
La expresión en el grupo con PE aumento significativamente 1.2 veces con respecto al grupo control ( $p=0.022$ ; Fig. 6) y 1.08 veces con respecto al grupo CTP, sin embargo no encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.111$ ) contra este último. Finalmente, el grupo CTP mostró un aumento en la expresión de 1.1-veces con respecto al grupo STP; sin embargo, no fue estadísticamente significativo ( $p=0.599$ ; Fig. 6).

### b) miR-141.

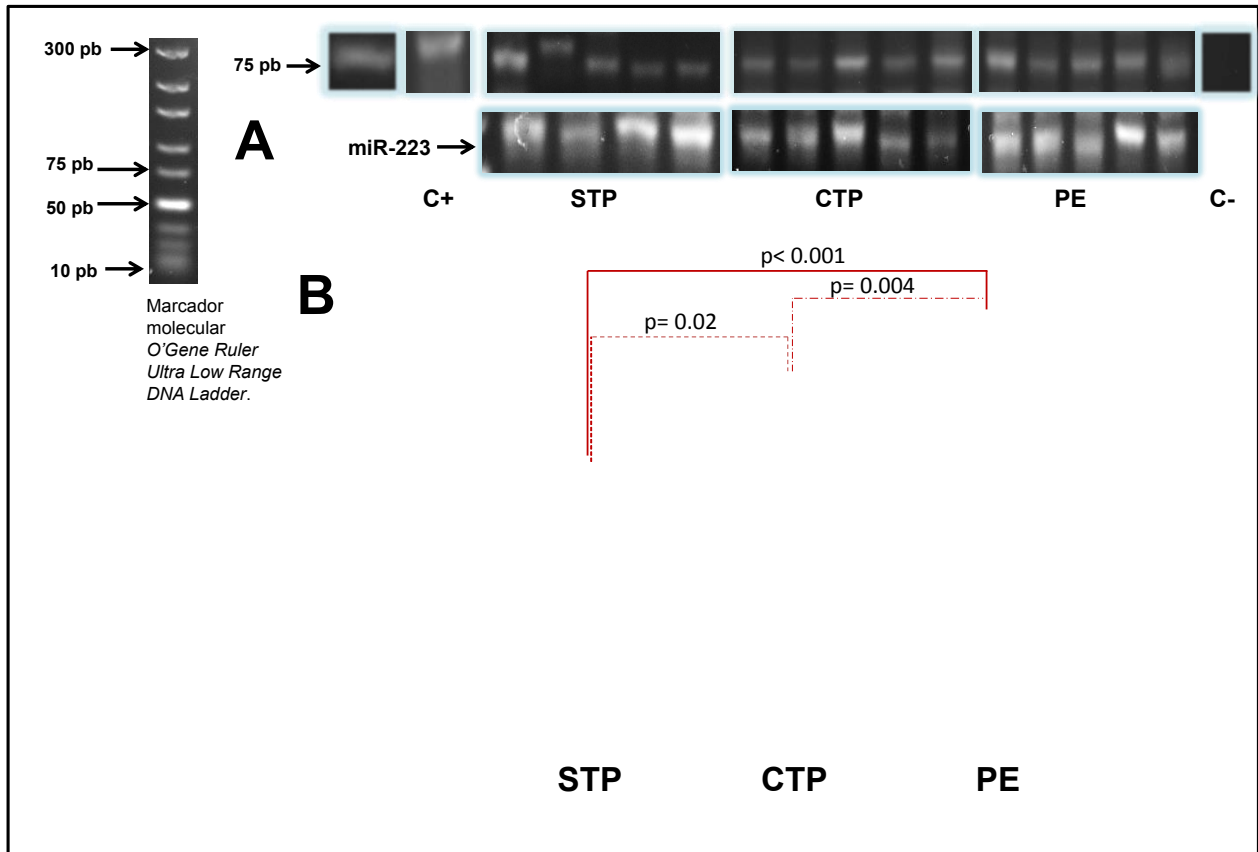
La expresión en el grupo con PE aumento significativamente 1.6-veces con respecto al grupo control ( $p<0.01$ ; Fig. 7) y 1.2 veces con respecto al grupo CTP; ( $p=0.02$ ). Finalmente, el grupo CTP mostró un aumento en la expresión de 1.35-veces con respecto al grupo STP ( $p=0.004$ ; Fig. 7).

### c) miR-376c.

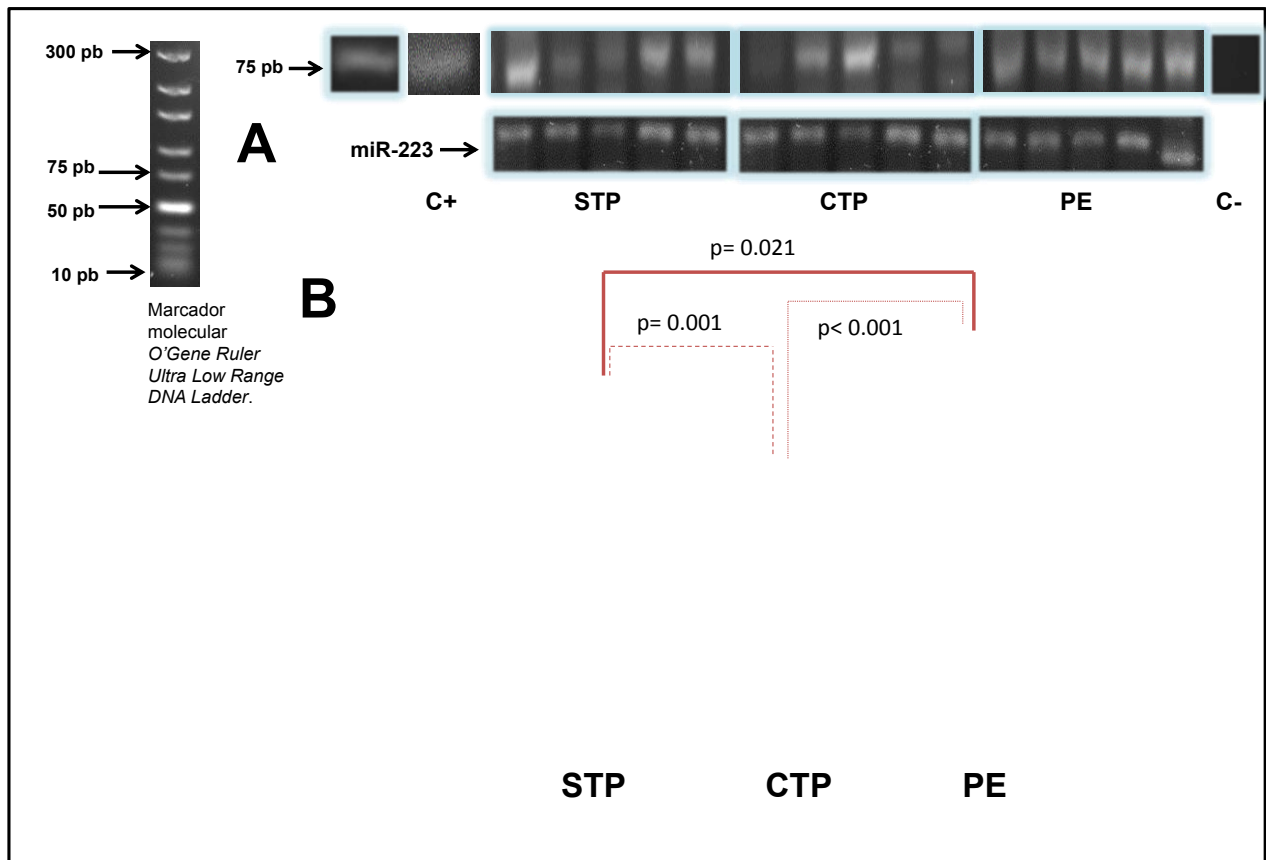
La expresión en el grupo con PE aumento significativamente 1.15-veces con respecto al grupo control ( $p=0.021$ ; Fig. 8) y 1.48 veces con respecto al grupo CTP; ( $p \leq 0.001$ ). Finalmente, el grupo CTP mostró una disminución significativa de 1.28-veces con respecto al grupo STP ( $p=0.004$ ; Fig. 8).



**Figura 6. Expresión diferencial del miR-29a.** (A) Gel de agarosa que muestra la banda de expresión del miR-29a de las pacientes con preeclampsia (PE), con (CTP) y sin trabajo de parto activo (STP) y del miR-223 (constitutivo). La imagen muestra el control positivo (C+) y negativo (C-). La banda de expresión fue determinada a través de la medición de la densidad óptica relativa de las bandas la cual fue corregida por el miR-223 (B). Los resultados son mostrados como la media  $\pm$  error estándar y en cada caso se muestra la diferencia estadística.



**Figura 7. Expresión diferencial del miR-141.** A) Gel de agarosa que muestra la banda de expresión del miR-141 en pacientes con diagnóstico de Preeclampsia (PE), con (CTP) y sin trabajo de parto activo (STP) y del miR-223 (constitutivo). La imagen muestra el control positivo (C+) y negativo (C-). La banda de expresión fue determinada a través de la medición de la densidad óptica relativa de las bandas la cual fue corregida por el miR-223 (B). Los resultados son mostrados como la media  $\pm$  error estándar y en cada caso se muestra la diferencia estadística.



**Figura 7. Expresión diferencial del miR-376c.** A) Gel de agarosa que muestra la banda de expresión del miR-376c en pacientes con diagnóstico de preeclampsia (PE), con (CTP) y sin trabajo de parto activo (STP) y del miR-223 (constitutivo). La imagen muestra el control positivo (C+) y negativo (C-). La banda de expresión fue determinada a través de la medición de la densidad óptica relativa de las bandas la cual fue corregida por el miR-223 (B). Los resultados son mostrados como la media  $\pm$  error estándar y en cada caso se muestra la diferencia estadística.



## 9. DISCUSIÓN

Los miRNAs participan activamente en el desarrollo placentario y por lo tanto su desregulación puede contribuir a complicaciones durante el embarazo. Se ha propuesto que estos miRNAs tienen roles importantes en la regulación de la diferenciación celular y la inmunomodulación durante el embarazo.<sup>40</sup> Los principales hallazgos en el presente estudio son: 1) La expresión del miR-29a, 141 y 376c en el grupo de PE con respecto al grupo de STP aumentaron 1.2, 1.6 y 1.15 veces respectivamente.

Se encuentra bien documentado que un número importante de miRNAs son producidos en la placenta humana, y además algunos se expresan específicamente en diferentes estadios de la placentación así como también en diferentes etapas gestacionales.<sup>17</sup> Morales et al. (2012) reportaron la expresión de 91 miRNAs en cultivos primarios de trofoblastos aislados de placentas y células trofoblásticas inmortales. Por otro lado, también se ha revelado que los miRNAs tienen un efecto regulatorio sobre la proliferación, migración, invasión, apoptosis y angiogénesis de las células trofoblásticas.<sup>42</sup> Por ejemplo, en el estudio de Xie et al. (2014) se demostró que los miRNAs del clúster C19MC se encargan de modular la migración de los trofoblastos extravillosos (EVTs), y además propusieron que la secreción de miRNAs al torrente sanguíneo puede jugar un importante rol en la adaptación materna al embarazo.<sup>41</sup> Por otro lado, diversos estudios han demostrado la expresión diferencial de un gran número de miRNAs en placentas con diferentes patologías y complicaciones durante el embarazo como la PE, embarazos pretérmino, diabetes gestacional y RCIU.<sup>42</sup> Las investigaciones de Pineles et al. (2007), Zhu et al. (2009) y Hu et al. reportaron una desregulación en la expresión diferencial de diversos miRNAs en placentas de mujeres con PE en comparación con placentas de mujeres sanas.

De este modo, se ha demostrado que el miR-141 se expresa específicamente en placentas humanas. Chim et al. (2008) lo identificaron y cuantificaron en placentas humanas y suero, el cual se encontró en altas concentraciones tanto en tejido placentario como en suero materno.

El miR-29a fue estudiado por Gu et al. (2012) en tejido placentario de mujeres embarazadas en el primer y tercer trimestre de embarazo, y durante el tercer trimestre de embarazo se encontró un incremento en su perfil de expresión en comparación con las placentas de mujeres con un trimestre de embarazo.

La expresión del miR-376c en tejido placentario y suero sanguíneo de acuerdo al estudio de Fu et al. (2012), se encontraba incrementada en los últimos trimestres de embarazo, a diferencia del estudio de Morales et al. (2012) en donde su expresión se encontraba incrementada en los primeros trimestres de embarazo, posiblemente debido a los métodos utilizados en cada caso.

El mecanismo de acción del miR-29a sobre el desarrollo placentario no está estudiado. Se sabe que juega un papel muy importante en la regulación de diversos procesos cancerosos ya que se encuentra asociado a la supresión del crecimiento, invasión y migración de células tumorales pulmonares al inhibir moléculas de adhesión <sup>42</sup>, sin embargo algunos estudios sugieren que también puede promover la metástasis en el cáncer de mama. También se ha reportado que puede inhibir la actividad de la MMP2 en el cáncer de colon y por lo tanto evitar la progresión de la enfermedad. <sup>43</sup> Xian et al. (2014) estudiaron el papel del miR-29a en la regulación durante la implantación uterina del embrión en ratas, y descubrieron que actúa sobre los genes que expresan los factores proapoptóticos Bak-1 y Bmf y antiapoptótico Bcl-w. <sup>44</sup> El posible papel del miR-29a sobre los trofoblastos puede estar en la regulación sobre su apoptosis. Nuestros resultados muestran un incremento de 1.1 veces la expresión del miR-29 en el grupo de PE con respecto al grupo control STP. Durante el proceso de PE, este miRNA se encuentra sobre-expresado y por lo tanto, su acción sobre los genes que inhiben

la apoptosis de los trofoblastos propiciaría un descenso en el número de trofoblastos.

Recientemente Tang et al. (2013) <sup>47</sup> demostraron que el miR-141 puede regular a los genes PLAG1 y E2F3; el mRNA que codifica para el gen PLAG1 puede ser reprimido a nivel transcripcional y post-transcripcional, mientras que la expresión del gen E2F3 puede inhibirse únicamente a nivel post-transcripcional. El gen PLAG1 actúa como proto-oncogen en diversos tipos de tumores, pero también participa durante la embriogénesis y se expresa de manera importante en la placenta. Los mismos autores han reportado que PLAG1 puede inhibir o inducir la expresión de los genes que codifican para: IGF2 (factor de crecimiento insulínico tipo 2); BPGF1 (Factor de crecimiento 1 derivado de huesos); CLF1 (cytokine-like factor 1); CGB (cadena beta de la coriogonadotropina); VEGF (factor de crecimiento endotelial y vascular) y PIGF (factor de crecimiento placentario). El gen E2F ha sido descrito como regulador de la apoptosis y es esencial para la proliferación celular durante la embriogénesis, el desarrollo placentario y la viabilidad fetal. El factor de transcripción E2F3 se genera a partir del gen E2F, y juega un papel muy importante en el desarrollo de tejido placentario.

Según datos bioinformáticos, el miR-141 también podría regular las vías de señalización MAPK y Wnt. La vía MAPK regula el crecimiento y diferenciación celular, y su desregulación contribuye a deficiencias en la placentación; en tanto que la vía Wnt está implicada en la proliferación celular y apoptosis.<sup>66</sup>

Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión del miR-141 en el grupo de PE. La sobre-expresión del miR-141 puede inhibir la expresión a PLAG1 y E2F3, los cuales como ya se ha mencionado participan activamente en la placentación, mientras que PLAG1 provoca la desregulación de los factores VEGF y PIGF que promueven la angiogénesis y el desarrollo de la placenta. Es bien sabido que la desregulación de estos factores es una pieza clave en el mecanismo patogénico de la PE, y por lo tanto la sobre-expresión del miR-141 podría dar lugar a la aparición de la enfermedad. Por otro lado, de confirmarse la acción del miR-

141 sobre las vías de señalización MAPK y Wnt, serían un factor más para el desarrollo de la PE.

Existe también una diferencia significativa entre los grupos CTP vs PE y STP vs CTP. Estos resultados nos indican que el miR-141 puede estar involucrado durante procesos inflamatorios.

Fu et al. (2013) demostraron que el miR-376c puede bloquear la activación de la vía Nodal/ALK7 promoviendo la proliferación y migración de trofoblastos. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) es un importante grupo de factores que se están implicados en el desarrollo de múltiples enfermedades incluyendo a las cardiovasculares, y además se ha reportado que se encuentra altamente expresado en placentas de mujeres con PE inhibiendo la proliferación, diferenciación e invasión de trofoblastos. Nodal es una proteína que pertenece a la familia TGF- $\beta$ , y en células humanas embrionarias troncales (hESCs) se encarga de su mantenimiento y su autorenovación. Nodal actúa sobre el receptor de activina/kinasa 7 (ALK7) para inhibir la proliferación e invasión de trofoblastos, y tanto el receptor ALK7 como Nodal se encuentran sobre-regulados en placentas de mujeres con PE, por lo que concluyen que la desregulación de ambos puede dar origen al desarrollo de la PE. Además el mismo autor, demostró que el miR-376c puede bloquear la activación de la vía Nodal/ALK7 promoviendo la proliferación y migración de trofoblastos. En nuestro estudio, se muestra un aumento en la expresión del miR-376c en el grupo de PE al ser comparado con el grupo STP. La sobre-expresión del miR-376c daría como resultado la desregulación de la vía Nodal/ALK7 propiciando la aparición de la enfermedad, debido a la inhibición de la proliferación e invasión de los trofoblastos y propiciando una mala placentación. Es interesante que la expresión del miRNA en el grupo CTP disminuyó de manera significativa con respecto al grupo STP. No existen estudios que instiguen el papel del miR-376 en los últimos trimestres del embarazo, sin embargo este fenómeno implicaría que el miR-376c actúa específicamente en los primeros trimestres del embarazo en el desarrollo placentario como ya se ha mencionado anteriormente.

Es importante señalar que se necesita aumentar el número de muestras para determinar los rangos en los que serán utilizados los miRNAs como biomarcadores de la PE. Por otro lado, actualmente se están recolectando muestras de mujeres que no han desarrollado la enfermedad a las cuales se les llevará un seguimiento clínico, y se observará si existe desarrollo de la PE, y de esta forma se podrá determinar si estos miRNAs pueden ser utilizados como biomarcadores de fases tempranas de la PE.

La siguiente fase de la investigación será investigar los blancos de los miRNAs utilizados en un cultivo primario de trofoblastos y sincitiotrofoblastos, esto con el fin de evaluar su papel en ambos tipos de células y cuál es su posible mecanismo de acción durante la placentación y durante la PE.

## 10. CONCLUSIONES

- De acuerdo a nuestros resultados, es posible la identificación de los miRNAs 29a, 141 y 376c en plasma materno.
- Nuestros hallazgos sugieren que de realizarse un mayor número de pruebas, y al aumentar el tamaño de la población estudiada los miRNAs 29a, 141 y 376c podrían ser utilizados como biomarcadores de la PE.

## 11. PERSPECTIVAS

- Nos hemos propuesto incrementar el tamaño de nuestra población para continuar con el estudio de los miRNAs analizados en este trabajo, y de esta forma confirmar su uso como biomarcadores de la enfermedad.
- Actualmente se están recolectando muestras de sangre de mujeres con menos de 20 semanas de gestación, las cuales no presentan signos de PE. Esto con el fin de identificar los miRNAs analizados en este trabajo en antes de la aparición de la enfermedad, y confirmar si es posible utilizarlos como biomarcadores en fases tempranas de la PE.
- El mecanismo de acción del miRNA 29a en placentas humanas no se encuentra completamente dilucidado, por lo que en la siguiente fase del proyecto se investigará sus miRNAs blancos en cultivos de trofoblastos y sincitiotrofoblastos.

## 12. REFERENCIAS

1. Cruz PR, et al. **Detección y Diagnóstico de enfermedades hipertensivas durante el embarazo.** México: Secretaria de Salud. 2010.
2. Calzada EM, et al. **Atención integral de la preeclampsia en el segundo y tercer niveles de atención.** México: Secretaria de Salud. 2008.
3. INEGI. **Estadísticas a propósito del día mundial de la salud.** 7 de abril del 2013]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/salud0.pdf>
4. INPer. **Informe de Rendición de cuentas de la Administración pública federal.** [28 de septiembre del 2012]. Disponible en: [http://www.inper.edu.mx/descargas/pdf/IRC\\_INPer\\_2.pdf](http://www.inper.edu.mx/descargas/pdf/IRC_INPer_2.pdf).
5. Leis MT, et al. **Diagnóstico y tratamiento de la Preeclampsia-Eclampsia.** Ginecol Obstet Mex 2010; 78(6): 491-525.
6. Roberts JM, et al. **Hypertension in Pregnancy.** Obstetrics & Gynecology. 2013; 122(5): 1122-1131.
7. ACOG. **Key elements for the Management of Hypertensive Crisis in Pregnancy (In-Patient).** 2013. Disponible en: [http://www.acog.org/~media/Districts/District%20II/PDFs/Optimizing\\_Protocols\\_In\\_OB\\_HTN\\_Series\\_3-%20Version%201.pdf?dmc=1](http://www.acog.org/~media/Districts/District%20II/PDFs/Optimizing_Protocols_In_OB_HTN_Series_3-%20Version%201.pdf?dmc=1)
8. Naljayan MV, et al. **New Developments in the pathogenesis of preeclampsia.** Adv Chronic Kidney Dis. 2013; 20(3): 265–270.
9. Al-Jameil N, et al. **A brief overview of preeclampsia.** J Clin Med Res. 2014; 6(1): 1–7.
10. Karumanchi SA, et al. **Preeclampsia: A renal perspective.** Kidney International. 2005; 67(2005): 2101-2113.



11. Paré E, et al. **Clinical Risk Factor for Preeclampsia in the 21<sup>st</sup> Century.** *Obstetrics & Gynecology.* 2014; 124(4): 763-770.
12. Ramesh K, et al. **Socio-Demographic and Other Risk Factors of Preeclampsia at Tertiary Care Hospital, Karnataka: Case Control Study.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014; 8(9): JC01-JC02.
13. Mireles P, et al. **Risk factors for pre-eclampsia/eclampsia among working women in Mexico City.** *Pediatric Perinatal Epidemiology.* 2001; 15: 40-46.
14. Kumar S, et al. **Determinants of Pre-eclampsia: A Case-control Study in a District Hospital in South.** *Indian J Community Med.* 2010; 35(4): 502-05.
15. Lamminpää R, et al. **Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008.** *BMC Pregnancy Childbirth.* 2012; 11: 12:47.
16. Kirsten D, et al. **Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies.** *BMJ.* 2005; 330: 565.
17. Conde A, et al. **Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women.** *Bjog.* 2000; 107: 75-83.
18. Marviel P, et al. **Risk factors of pre - eclampsia in a single pregnancy.** *J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris.* 2008; 37: 477-82.
19. Dejene F, et al. **Age at Menarche, Menstrual Characteristics, and Risk of Preeclampsia.** *ISRN Obstetrics and Gynecology.* 2011; doi:10.5402/2011/472083.
20. Noris M, et al. **Mechanisms of Disease: pre-eclampsia.** *Nature Clinical Practice Nephrology.* 2005; 1(2): 98-114.
21. Poon LC, Nicolaidis KH. **Early Prediction of Preeclampsia.** *Obstetrics and Gynecology International.* Volume 2014. Article ID 297397.
22. Choudhury M, et al. **Epigenetics and microRNAs in Preeclampsia.** *Clin Exp Hypertens.* 2012; 34(5): 334-341.

23. Haram K, et al. **Genetic Aspects of Preeclampsia and HELLP Syndrome.** Journal of Pregnancy. vol. 201, Article ID 910751, 13 pages, 2014.
24. Yegüez MF. **Etiopatogenia de la Preeclampsia.** Gac Méd Caracas 2007; 115(4): 273-281.
25. Pacheco J. **Preeclampsia/eclampsia: Reto para el ginecoobstetra.** Acta Med Per 2006; 23(2): 100-111.
26. Villanueva LE, et al. **Conceptos actuales sobre la Preeclampsia-eclampsia.** Rev Fac Med UNAM. 2007; 50(2): 57-61.
27. Sadler TW. **Embriología médica con orientación clínica.** 10a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2009.
28. Rohen JW, Elke LD. **Embriología funcional, Una perspectiva desde la biología del desarrollo.** 3ra ed. Madrid: Médica Panamericana. 2007.
29. Tannetta D, et al. **Placental Disease and the Maternal Syndrome of Preeclampsia: Missing Links?.** Curr Hyperens Rep. 2013; 15: 590-599.
30. Jeevaratnam K, et al. **Periodic assessment of plasma sFlt-1 and PIGF concentrations and its association with placental morphometry in gestational hypertension (GH) - a prospective follow-up study.** BMC Pregnancy and Childbirth. 2010; 10: 1-8.
31. Romero R, et al. **A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for age neonate.** The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. 2008; 21(1): 9-23.
32. López JM. **Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia.** Nephrol Dial Transplant. 2007; 22: 712-714.

33. Gaber K, et al. **Soluble Endoglin as a new marker for prediction of pre-eclampsia in early pregnancy.** Middle East Fertility Society Journal. 2010; 15: 42–46.
34. Wallenburg HCS. **Hemodynamics of hypertensive pregnancy, in Handbook of Hypertension.** New York: Elsevier Science, 1988.
35. Victor R, et al. **The sympathetic nervous system in human hypertension, in Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.** 2nd ed. New York: Raven Press, 1998.
36. Sibai BM. **Intergenerational factors: a missing link for preeclampsia, fetal growth restriction, and cardiovascular disease?** Hypertension. 2008;51(4):993-994.
37. Lykke JA, et al. **Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother.** Hypertension. 2009;53(6):944- 951.
38. Thais AF, et al. **Preeclampsia (marker of chronic kidney disease): from genesis to future risk.** J Bras Nephrol. 2012;34(1):87-93.
39. Lebedev TD, et al. **Transfer and expression of Small interfering RNAs in Mammalian Cells Using Lentiviral Vectors.** Acta Natura. 2013; 5(2): 7-18.
40. Rigoutsos I. **New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites.** Cancer Res. 2009; 69(8): 3245–3248.
41. Vazquez OG, et al. **Grandes alcances de los RNAs pequeños RNA de interferencia y microRNA.** Revista de Investigación Clínica. 2006; 58(4): 335-349.
42. Kim VN, et al. **Biogenesis of small RNAs in animals.** Molecular Cell Biology. 2009; 10: 126-139.
43. Siomi H, et al. **Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in animals.** Molecular Cell. 2010; 38: 323-332.
44. Friedman, R.C, et al. **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** Genome Res. 2009; 19: 92–105.

45. Kim YJ. **Pathogenesis and promising non-invasive markers for Preeclampsia.** *Obstetrics and Gynecology Science.* 2013; 56(1): 2-7.
46. Cortez MA, et al. **MicroRNA identification in serum and plasma: a new tool to diagnose and monitor diseases.** *Expert Opinion Biol. Ther.* 2006; 9(6): 703-711.
47. Zeng Y. **Principles of microRNA production and maturation.** *Oncogene.* 2006; 25: 6156- 6162.
48. Díaz NF, et al. **MicroRNAs in central nervous system development.** *Reviews in the Neurosciences.*2014. DOI. 10.1515/revneuro-2014-0014.
49. Carthew R, et al. **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell.* 2009; 136: 642-645.
50. Chen C, et al. **Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR.** *Nucleic Acids Research.* 2005; 33(20): 1-9.
51. Wu L, et al. **Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies.** *Reproduction.* 2012; 143: 389-397.
52. Kiyonori M, et al. **Identification of Pregnancy-Associated MicroRNAs in Maternal Plasma.** *Clinical Chemistry.* 2010; 56(11): 1767-1771.
53. Donker RB, et al. **The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis Proteins in normal and hypoxic trophoblasts.** *Mol. Hum. Reprod.* 2007; 13: 273–279.
54. Luo SS, et al. **Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes.** *Biol Reprod.* 2009; 81: 717-729.
55. Pineles BL, et al. **Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia.** *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196: 261 e261-266.
56. Hailing L, et al. **Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies.** *Biomed Research International.* Vol. 2013. Article ID 970265, 9 páginas.

57. Zhu XM, et al. **Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies.** Am J Obstet Gynecol 2009; 200: 661 e661-667.
58. Gu Y, et al. **Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013; 304: E836–E843.
59. Xie L, et al. **C19MC MicroRNAs Regulate the Migration of Human Trophoblasts.** Endocrinology. 2014; 155 (12): 4975-4985.
60. Fu G, et al. **MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy complications.** Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 5519-5544.
61. Han HS, et al. **MicroRNA-29a suppresses the growth, migration, and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6.** FEBS Letters. 2014; 588 (20): 3744-3750.
62. Ding Q, et al. **APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis.** J Clin Invest. 2011; 121(11):4526–4536.
63. Xian HF, et al. **MicroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat.** The FEBS Journal. 2014; 281(7): 1872-1891.
64. Rudov A, et al. **Involvement of miRNAs in Placental Alterations Mediated by Oxidative Stress.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Article ID 103068, 2014.
65. Chim SS, et al. **Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma.** Clin Chem. 2008; 54: 482–490
66. Tang Q, et al. **miR-141 Contributes to Fetal Growth Restriction by Regulating PLAG1 Expression.** PLoS ONE. 2013; 8(3): e58737.
67. Morales DM, et al. **MicroRNA expression profiles in trophoblastic cells.** Placenta. 2012; 33: 725-734

68. Fu G, et al. **MicroRNA-376c Impairs Transforming Growth Factor- $\beta$  and Nodal Signaling to Promote Trophoblast Cell Proliferation and Invasion.** Hypertension. 2013; 61: 864-872
69. Oglesby IK, et al. **MicroRNAs in inflammatory lung disease– master regulators or target practice?** Respiratory Research. 2010; 11:148.

## 13. ANEXOS

### 13.1. Carta de aceptación institucional



Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes

Dirección General

"2013, Año de la Lealtad Institucional, y Centenario del Ejército Mexicano"

1000.2013: - 000699

México, D.F., a 01 de Octubre de 2013

**M. en C. Héctor Flores Herrera**  
Investigador en Ciencia Médica "C"  
Adscrito al Departamento de Inmuno-Bioquímica

Me es grato informar a Usted, y a su grupo de colaboradores, que las Comisiones de Investigación y Ética en Investigación han revisado y emitido el dictamen correspondiente a su proyecto:

**"Perfil de secreción de las proteínas de choque térmico y determinación de la expresión de microRNAs en pacientes con desarrollo de preeclampsia"**

**ACEPTADO**


**Registro: 212250-3210091**

En cuanto al monto económico solicitado por Usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos federales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los recursos entregados por agencias financiadoras externas.

Me permito hacer de su conocimiento que al término del desarrollo de este proyecto Usted deberá entregar un **informe técnico final**, (según el formato institucional) disponible en [www.inper.mx/investigacion.html](http://www.inper.mx/investigacion.html), para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

  
Dr. Javier Mancilla Ramirez  
Director General

## 13.2. Consentimiento informado

### TEXTO DECLARATORIO

Estimada señora:

Por medio de la presente le informamos que en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

#### **PERFIL DE SECRECIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TERMICO Y DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE microRNAs EN PACIENTES CON DESARROLLO DE PREECLAMPSIA.**

La preeclampsia es una enfermedad del embarazo y está asociada con los nacimientos antes de llegar a término del embarazo y está asociada con enfermedades y de la mamá y del bebé. La preeclampsia, se presenta después de la semana 20 de gestación y clínicamente se manifiesta por la elevación de la presión arterial, dolores de cabeza y problemas visuales.

El principal objetivo de este estudio es cuantificar el incremento de proteínas que están relacionadas con el desarrollo de la preeclampsia.

El estudio consiste en

1. Se le limpiará la zona del antebrazo para tomarle 5 mililitros de sangre, este procedimiento será realizado por el personal médico responsable del Instituto y no representa ningún riesgo para usted.
2. La muestra será analizada en el departamento de la Bioquímica y Biología Molecular de este Instituto donde se determinará la concentración de proteínas asociadas a la preeclampsia.

Su participación en este estudio permitiría contribuir en forma importante a la comprensión del desarrollo de la preeclampsia. En caso de que usted no acepte participar, **no tendrá ninguna repercusión** en la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto, ni tampoco se incrementará el costo de la atención médica que ambos reciban. Así mismo le informamos que usted tiene la libertad de retirarse del estudio sin que tenga ningún efecto sobre la atención médica de usted o de su bebé. Este estudio no producirá **ningún costo adicional**; así mismo, le informamos que a usted no se le remunerará por su participación. La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será usada sólo para fines de investigación.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con el M en C. C Héctor Flores Herrera al teléfono 55 20 99 00 Ext 346 de Lunes a Viernes de 8:00 am a 4:00 pm. También en será atendida vía correo electrónico en la dirección [floresh8@yahoo.com](mailto:floresh8@yahoo.com)

Dra. Mónica Flores Ramos Presidente del Comité de Ética en Investigación

Jefa del Departamento de Neurociencias.

e-mail: flores\_ramos@hotmail.com



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO \_\_\_\_\_

(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho.

En el caso que yo decida retirarlo, deberán seguir las siguientes indicaciones:

---

---

---

---

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

PARTICIPANTE  
REPRESENTANTE  
INVESTIGADOR  
TESTIGO  
TESTIGO

NOMBRE

FIRMA

