

**APROXIMACIÓN GENÓMICA A GRAN ESCALA PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE NUEVOS MARCADORES MOLECULARES DE PREECLAMPSIA**

HENRY MAURICIO CHAPARRO SOLANO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ D.C

**APROXIMACIÓN GENÓMICA A GRAN ESCALA PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE NUEVOS MARCADORES MOLECULARES DE PREECLAMPSIA**

HENRY MAURICIO CHAPARRO SOLANO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

PAUL LAISSUE HORMAZA, MD, PhD, HDR

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ D.C

2019

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“Las Universidades del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

**APROXIMACIÓN GENÓMICA A GRAN ESCALA PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE NUEVOS MARCADORES MOLECULARES DE PREECLAMPSIA**

HENRY MAURICIO CHAPARRO SOLANO

**PAUL LAISSUE HORMAZA, MD, PhD, HDR
DIRECTOR**

**ÁNGELA MARÍA RUIZ STERNBERG
JURADO**

**DORA JANETH FONSECA MENDOZA
JURADO**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, amigos y maestros.

A éste Claustro y su Bordadita que tantas alegrías me han regalado.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 PLACENTACIÓN	13
2.2 ASPECTOS MOLECULARES DE LA PLACENTACIÓN	16
2.3 PREECLAMPSIA	20
2.4 FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR DE LA PREECLAMPSIA.....	23
2.5 ESTUDIOS GENÉTICOS DE LA PREECLAMPSIA	29
2.6 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN – NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS).....	36
2.6.1 Preparación de librerías para NGS.....	37
2.6.2 Secuenciación-NGS	38
2.6.3 Análisis de datos derivados de NGS.....	39
3. PREGUNTA CIENTÍFICA	41
4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	42
4.1 OBJETIVO GENERAL	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1 POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	43
5.2 RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ADN PLACENTARIO	44
5.3 PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA Y SECUENCIACIÓN NGS	45
5.4 ALGORITMO DE SELECCIÓN DE VARIANTES CANDIDATAS	46
5.5 CONFIRMACIÓN DE VARIANTES POR SECUENCIACIÓN DE SANGER	46
6. RESULTADOS	50

6.1 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN (NGS)	50
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
9. REFERENCIAS	61
10. ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Remodelación arterial durante la invasión trofoblástica en condiciones de normalidad y preeclampsia** Modificado de (Chaiworapongsa, Chaemsaitong, Yeo, & Romero, 2014).....23
- Figura 2. Resultados aplicación del algoritmo de selección de variantes**51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Trabajos de investigación asociados al estudio molecular de la PE.....	33
Tabla 2. Primers de secuenciación para variantes candidatas.....	47
Tabla 3. Variantes confirmadas por secuenciación de Sanger.....	52

LISTA DE ANEXOS

Anexo	1.	Subset	de	genes	candidate	de	
preeclampsia.....							73

RESUMEN

A pesar de que la preeclampsia (PE) es una de las principales causas de morbilidad materna y fetal, su etiología es desconocida. Con el objetivo de determinar nuevos genes y mutaciones potencialmente etiológicos de la enfermedad, en el presente trabajo efectuamos la secuenciación simultánea de 386 genes, a partir de ADN placentario, en 60 mujeres afectadas por PE y restricción de crecimiento intrauterino (RCIU). Computacionalmente, utilizamos rigurosos filtros de selección de variantes. Identificamos 21 variantes (21 genes), entre las cuales 14 fueron confirmadas por medio de secuenciación de Sanger (*AGT, ERAP1, F5, FOS, HTRA3, KDR, LIPC, MAN1C1, PDGFRA, SIAE, TET2, TGFB2, TGFB3, VCAN*). Aquellos genes con variantes que participan en procesos biológicos como coagulación, modulación de la función inmunológica y angiogénesis llamaron especialmente la atención por su íntima relación con el desarrollo y función placentaria. Los resultados obtenidos son innovadores y sugieren una etiología poligénica de la PE. En el futuro, para una mejor comprensión de los resultados en el marco de la función placentaria, son imperativos estudios adicionales in vitro e in vivo.

1. INTRODUCCIÓN

La PE es un desorden hipertensivo del embarazo que afecta alrededor del 7% de las mujeres. Su diagnóstico se confirma por la presencia de cifras de tensión arterial mayores a 140/90 mmHg después de la semana 20 de gestación, proteinuria (>300 mg/dL) y síntomas de vasoespasmo como cefalea, epigastralgia, y tinnitus, entre otros (Bdolah, Karumanchi, & Sachs, 2005).

A pesar de que esta patología es una de las principales causas de morbilidad materna y fetal, su etiología y mecanismos precisos de desarrollo son aún desconocidos. Se ha reportado que su aparición tiene un componente hereditario y se ha propuesto que su origen esté asociado con variantes en la secuencia de ADN de numerosos genes (Glotov et al., 2018).

Estudios de ligamiento y de asociación del genoma completo (GWAS), efectuados en grupos poblacionales específicos, como noruegos y holandeses, permitieron la identificación de regiones cromosómicas y genes candidato relevantes. Sin embargo, este tipo de aproximaciones han resultado incompletas para la comprensión profunda de las vías moleculares involucradas en su etiología (Glotov et al., 2018).

El presente trabajo de tesis se focalizó, por medio de secuenciación de siguiente generación, en la identificación de nuevos genes y variantes candidatos que pudieran ser utilizados en un futuro como marcadores genéticos para el diagnóstico temprano y la prevención de la PE.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PLACENTACIÓN

La placenta es una estructura discoidea, derivada de dos elementos fundamentales: un epitelio externo que proviene del linaje celular trofoblástico y una red vascular subyacente interna acompañada de estroma, que se genera a partir del mesodermo embrionario. Luego de la fusión de las membranas fetales con la mucosa uterina, ésta última se encarga de cumplir con las funciones de los principales sistemas orgánicos del feto durante el desarrollo. La interacción exitosa entre los componentes maternos y fetales de la placenta es fundamental para asegurar un embarazo en condiciones fisiológicas (Burton & Jauniaux, 2015; Cross, 2000). Cada evento del desarrollo que conduce a la formación de una placenta madura depende de la transformación de estructuras previas (Maltepe, Bakardjiev, & Fisher, 2010). El componente materno de la placenta, se refiere específicamente al endometrio, el cual presenta una transición epitelial para generar la decidua durante las primeras etapas de la gestación. En algunos casos, la placenta puede invadir tejidos diferentes, como ocurre en los embarazos ectópicos (Burton & Jauniaux, 2015).

La implantación en el humano es un proceso altamente invasivo, durante el cual el embrión por medio del sincitiotrofoblasto se introduce de manera completa en la superficie del endometrio, atravesando las células epiteliales y estromales del tejido. Lo anterior ocurre alrededor del octavo día después de la fecundación, con el objetivo de asegurar una adecuada circulación útero placentaria, una vez se

produce el inicio del desarrollo embrionario. Debido a que durante las primeras etapas de la gestación la circulación coriónica es baja, el sincitiotrofoblasto cumple con una función fundamental en cuanto al intercambio de nutrientes y oxígeno. Además, se encarga de captar las glicoproteínas maternas inmersas en las secreciones endometriales y entregar la cantidad de oxígeno adecuada para la organogénesis (Burton & Jauniaux, 2015).

Al finalizar el primer trimestre, la placenta “primitiva” inicia una remodelación para consolidar el órgano definitivo que acompañará al feto hasta el momento del parto. Éste proceso incluye el nacimiento de la circulación materna mediada por el estrés oxidativo producto del incremento en la concentración de oxígeno disponible. La diferencia en la concentración de oxígeno en las distintas etapas del embarazo, ha sido catalogada como un mecanismo de evolución del feto, por medio del cual se asegura la baja producción de especies reactivas de oxígeno alrededor del proceso de organogénesis, evitando el daño de los sistemas (Burton, Jauniaux, & Charnock-Jones, 2010).

El desarrollo de la circulación útero placentaria requiere que las arterias espiraladas uterinas, evolucionen desde arterias musculares altamente contraídas a conductos dilatados flácidos y flexibles con el objetivo de asegurar velocidad y constancia del flujo de sangre materna hacia la placenta. Las células del citotrofoblasto tienen una función fundamental en este proceso, pues participan de la migración hasta alcanzar el tercio medio del miometrio. La adecuada interacción entre el trofoblasto

extravelloso y el sistema inmune de la madre es necesaria para la transformación de las arterias. La liberación de citoquinas y factores de crecimiento por parte de las células *natural killer* uterinas activadas media este desarrollo. Las interacciones entre las células placentarias y el sistema inmune han evolucionado para cumplir funciones fisiológicas adicionales a las “clásicas inmunológicas”. Aparentemente, este tipo de invasión es un fenómeno exclusivo del humano entre otros primates superiores (Burton et al., 2010).

La placenta, al secretar más de 100 péptidos y hormonas esteroideas que modulan la fisiología materna, funciona como un importante órgano endocrino. Por ejemplo, la síntesis de la hormona de crecimiento se asocia a la suspensión del metabolismo en la hipófisis hacia la mitad del embarazo, y hormonas como la eritropoyetina y el angiotensinogéno median importantes adaptaciones cardiovasculares (Burton et al., 2010).

Recientemente, se ha determinado que los fragmentos placentarios liberados en la circulación de la madre son en realidad exosomas transcripcionalmente activos que tienen una función fundamental en la señalización del endotelio materno y el sistema inmune (Sarker et al., 2014).

Las funciones placentarias descritas hasta el momento, en gran medida dependen de la adecuada diferenciación y proliferación de las células provenientes del linaje trofoblástico (citotrofoblasto invasivo y el sincitiotrofoblasto multinucleado). Este proceso a su vez, precisa de una interacción coordinada entre señales genéticas,

epigenéticas y fisiológicas. Modelos animales, como el murino, han permitido descifrar los mecanismos moleculares participantes en la placentación (Maltepe et al., 2010). Sin embargo, los mecanismos precisos de especialización trofoblástica y la morfogénesis útero placentaria puedan cambiar de manera considerable entre las diferentes especies de mamíferos (Burton & Jauniaux, 2015; Cross, 2000).

2.2 ASPECTOS MOLECULARES DE LA PLACENTACIÓN

Durante la diferenciación de las células que componen el trofoblasto, se inician diversos programas genéticos que regulan el desarrollo de la placentación. Conocer los mecanismos moleculares fundamentales que controlan este proceso, permite la comprensión de las condiciones de normalidad y enfermedad durante el embarazo (Murthi et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, puesto que el modelo murino ha sido de gran utilidad para establecer las vías moleculares involucradas en la placentación, durante este apartado, se hará referencia a los genes ortólogos en humanos y murinos que participan en este proceso.

La implantación, y la posterior placentación, dependen en primera medida de la posición del blastómero. Únicamente las células que se encuentren en la capa externa y estén en contacto con la decidua se convertirán en el trofoblasto, mientras que las restantes serán parte de la masa celular interna. La expresión de diversos factores de transcripción (FT), como *SOX2*, *NANOG*, *CDX2* y *SALL4*, en el

trofoectodermo polar, permite el desarrollo de las células pluripotenciales del trofoblasto (Maltepe et al., 2010).

Los perfiles de expresión de un grupo de FT básicos hélice – bucle – hélice (bHLH, por sus siglas en inglés), regulan la diferenciación de una variedad de linajes celulares (Murthi et al., 2013). Los dominios de dimerización de los bHLH, confieren una importante flexibilidad para su función regulatoria durante la actividad transcripcional. Los genes *bHLH* se expresan dinámicamente durante la transformación de las células del citotrofoblasto extraveloso. *MASH2*, *HAND1* y *STRA13*, son algunos de estos. Estudios previos, han demostrado que la síntesis de estas proteínas varía, dependiendo del momento del desarrollo placentario. Por ejemplo, *MASH2* es negativamente regulado durante la fase de invasión del citotrofoblasto, mientras que por el contrario, *STRA13* es sobreexpresado (Janatpour et al., 1999).

Los genes *homebox*, también denominados homeóticos, contienen una secuencia altamente conservada de 183 nucleótidos, que codifica para un homeodominio de 61 aminoácidos, cuya especificidad de unión permite activar o reprimir la expresión de un conjunto de genes corriente abajo. Los *homebox* son esenciales para el control de aspectos específicos en cuanto al crecimiento y la diferenciación de la placenta. *DLX3*, *DLX4*, *GAX*, *ESX1L*, *HLX* y *TGIF-1*, han sido catalogados como genes homeóticos importantes tanto en el desarrollo embrionario como placentario. Entre ellos, *HLX*, se expresa de manera primordial en las células del citotrofoblasto durante las primeras etapas del desarrollo. La inactivación de *HLX* por medio de

siRNA, permitió identificar que algunos de sus genes diana (e.g. *CDKN1C*, *ELK1*, *CCNB1* y *JUN*) estaban involucrados en la regulación del ciclo celular. Además, *DLX3*, *DLX4* y *TGIF-1*, han sido relacionados con procesos de diferenciación y apoptosis celular (Murthi et al., 2013).

El sincitiotrofoblasto al no ser transcripcionalmente activo y tener una vida media corta, depende de las funciones moleculares del citotrofoblasto para asegurar su sobrevivencia durante la gestación (Forbes & Westwood, 2010).

La activación de genes involucrados en la síntesis de factores angiogénicos (e.g. *VEGFA* y *VEGFC*), proteínas vasodilatadoras como la adrenomedulina (*ADM*), y hormonas luteotróficas como el polipéptido beta de la hormona luteinizante (*LHB*), resulta fundamental durante la invasión del trofoblasto hacia la circulación materna (Cross, 2000).

Uno de los principales mediadores encargados de asegurar la acción del estrógeno es *LIF*, un miembro de la familia de citoquinas de la interleucina 6. *LIF* interactúa con su receptor *LIFR*, el cual a su vez se une a su co-receptor *gp130*, activando una cascada de señalización celular, resultando un elemento fundamental en el aseguramiento de la receptividad uterina y la implantación del blastocito. Deleción de este gen ha demostrado estar relacionado con fallas durante la implantación (Cha, Sun, & Dey, 2012).

Las células *natural killer* (NK) uterinas, al representar el 70% de los leucocitos en el lugar de la implantación, adquieren una función de regulación central durante la

invasión del trofoblasto extraveloso. Este tipo de NK cuenta con receptores tipo inmunoglobulina de célula asesina (KIRs) que interactúan con los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Se ha descrito que en el humano la expresión de *KIR2DL4* y *KIR3DL2* y su interacción con HLA-A y HLA-C en la decidua asegura una adecuada modulación inmunológica necesaria al momento de buscar una invasión exitosa (Schmidt, Morales-Prieto, Pastuschek, Fröhlich, & Markert, 2015). Las interacciones entre HLA/KIR, al igual que los factores angiogénicos y las hormonas luteotróficas no son los únicos factores de invasión relevantes durante éste proceso. La lectina 6 tipo inmunoglobulina fijadora de ácido siálico (*SIGLEC-6*) también está relacionada con el potencial de invasión del trofoblasto (Brinkman-Van der Linden et al., 2007).

El clúster de la galectina, ubicado en el cromosoma 19, participa durante la placentación con tres de sus cinco miembros (Schmidt et al., 2015). *LGALS13*, *LGALS14* y *LGALS15*, se expresan de manera específica en la placenta y se unen a la N-acetil-lactosamina localizada en la membrana apical del sincitiotrofoblasto. Al parecer, estas galectinas están involucradas en la interacción de las células inmunes maternas y el sincitiotrofoblasto, al inducir la apoptosis de las células T (Than et al., 2012).

Los microRNA (miRNA) son una clase de moléculas de RNA no codificantes, con una longitud promedio de 22 nucleótidos, que regulan algunas funciones biológicas tanto positiva como negativamente, dentro de las que se incluye la proliferación, la diferenciación celular y la neovascularización, bien sea a través de un

silenciamiento postranscripcional o por estimulación de la degradación de los transcritos (Morales-Prieto et al., 2012). Numerosos miRNA han sido relacionados con el desarrollo de la placentación; por ejemplo, los miRNA-375 y miR-219-p regulan la expresión del receptor de progesterona en el endometrio, el cual es necesario para el mantenimiento del embarazo y la invasión trofoblástica. El miRNA-302a está involucrado en la implantación embrionaria por medio de su participación en la vía de señalización molecular del receptor de TGF-B (Schmidt et al., 2015).

A lo largo de este apartado se han descrito tan solo algunas de las vías de señalización y los mecanismos moleculares de regulación que participan durante la placentación, pues se conoce que a este proceso se asocian otros múltiples genes con patrones sincrónicos de expresión que lo convierten en uno de los momentos de mayor complejidad molecular durante el embarazo. Se estima que cientos de moléculas están implicadas en la regulación de la implantación y el mantenimiento funcional del endometrio durante la gestación.

2.3 PREECLAMPSIA

La PE es un trastorno hipertensivo del embarazo con compromiso multisistémico, que se presenta después de la semana 20 de gestación, generalmente acompañado de proteinuria (300 mg en 24 horas) y cifras tensionales por encima de 140/90 mmHg. Si bien estos han sido definidos como los criterios “clásicos” de la enfermedad, en algunos casos, la ausencia de proteinuria es reemplazada por trombocitopenia (< 100,000 por microlitro), falla hepática (elevación de

transaminasas dos veces por encima del valor de referencia), falla renal (creatinina sérica mayor a 1.1 mg/dL), edema pulmonar o aparición aguda de alteraciones visuales o cerebrales (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013). La PE afecta alrededor del 5% al 7% de embarazos alrededor del mundo y representa una alta morbilidad y mortalidad tanto para la madre como para el feto. Las mujeres que desarrollan este trastorno hipertensivo tienen un riesgo aumentado de 3 a 25 veces de presentar complicaciones obstétricas severas frente a mujeres normotensas (Bdolah et al., 2005).

Como se ha mencionado, la placentación en el humano es un proceso molecular complejo y dinámico, en el que están involucrados diversos mecanismos celulares de regulación que permiten la expresión y la represión de genes dependiendo del momento del desarrollo en el cual se encuentre la placenta. Es importante señalar que los grupos celulares que interactúan durante la placentación provienen de dos individuos genéticamente distintos (madre y feto) y están compuestas en conjunto por tres genomas diferentes (paterno, materno y fetal). La falla de uno o más pasos en el diálogo placenta endometrio puede desencadenar disfunciones durante el embarazo, conducentes a la PE (Fisher, 2015).

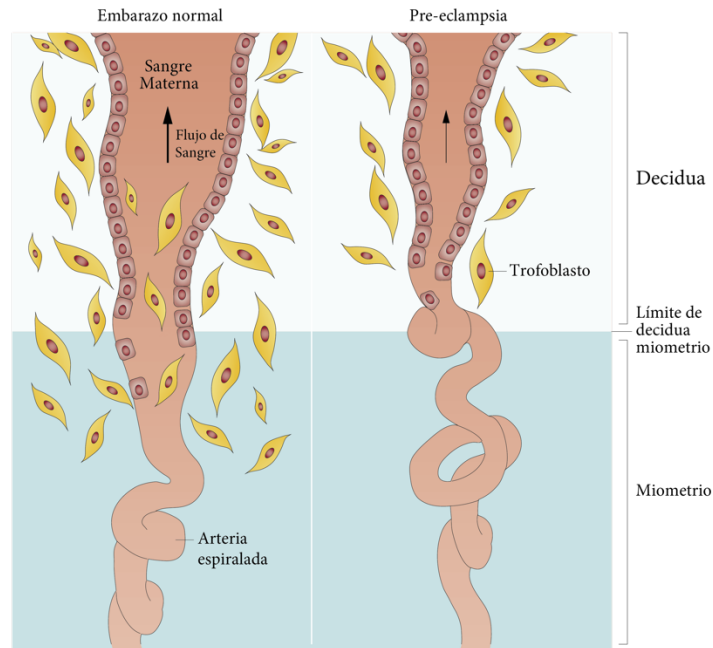
Si bien los factores etiológicos que causan esta enfermedad aún no son claros, se sabe que, mecanismos principalmente genéticos, inmunológicos y angiogénicos alrededor del desarrollo placentario participan durante la instauración de la patología. Embarazos en los cuales se desarrolla la PE, incluso en ausencia del feto, como es el caso de las molas hidatiformes, refuerzan la teoría de que la

placenta es un componente central en la instauración de la enfermedad (Bdolah et al., 2005).

En condiciones fisiológicas, durante la transformación que realiza el citotrofoblasto a la vasculatura uterina, las columnas inician un proceso de “imitación” en el cual inhiben la expresión de aquellas moléculas de tipo epitelial indicativas de su origen ectodérmico (Zhou, Genbacev, & Fisher, 2003). Por el contrario, se sobre expresan numerosos receptores y ligandos típicamente sintetizados por el endotelio o las células del músculo liso. El resultado final, es la transformación de las células placentarias en un endotelio arterial, que invade la túnica media de las arterias espiraladas, interactuando con éstas y asegurando así el flujo sanguíneo que requiere el feto para su desarrollo (Fisher, 2015).

En algunos casos, la invasión a las arterias es incompleta. Cuando esto ocurre, algunos vasos retienen partes de su revestimiento endotelial con capas musculares relativamente intactas y otros no son modificados, lo que conduce a que el suministro de flujo necesario para la placenta sea insuficiente. Esto se traduce en el aumento del estrés oxidativo y la generación de células espumosas al interior de la vasculatura placentaria (Figura 1). La presencia de células espumosas y radicales libres desencadena un proceso inflamatorio que compromete la interfase materno-fetal y junto con ello, la aparición de diversas alteraciones resultando en el desarrollo de la PE. La aparición de depósitos de fibrina, nudos sincitiales y el desprendimiento del sinciotrofoblasto son algunas de las aberraciones consecuentes del daño instaurado (Chaabane, Coen, & Bochaton-Piallat, 2014).

Figura 1. Remodelación arterial durante la invasión trofoblástica en condiciones de normalidad y preeclampsia Modificado de (Chaiworapongsa, Chaemsaitong, Yeo, & Romero, 2014).



Se ha propuesto que la instauración de la PE, depende de la presentación, en su orden específico, de los eventos mencionados anteriormente. La alteración de la invasión citotrofoblástica a la circulación materna, la hipoperfusión placentaria y la disminución de la superficie de contacto de las vellosidades coriónicas, una vez ocurren por primera vez, se repetirán de manera recurrente lo que culminará con la aparición de la enfermedad (Fisher, 2015).

2.4 FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR DE LA PREECLAMPSIA

Los fenómenos de invasión placentaria aberrante que ocurren durante la instauración de la PE, también se han asociado con otros desenlaces clínicos, como

la RCIU y el parto pre término. Se considera que la razón por la cual solo algunas mujeres con una placentación deficiente desarrollan PE, puede relacionarse con factores genéticos (Fisher, 2015).

Al parecer, la clave reside en las diferentes vías moleculares involucradas que conducen a una divergencia de los fenotipos maternos, fetales y placentarios. El proceso de diferenciación citotrofoblástica está marcado por cambios relevantes en los perfiles de expresión genético de las células que lo componen. Cualquier alteración de estos perfiles, conduce a que los procesos de vasculogénesis, inmunomodulación, remodelación tisular, entre otros, estén alterados, propiciando el desarrollo de la enfermedad (Fisher, 2015).

Por ejemplo, y como se mencionó anteriormente, una adecuada regulación inmunológica en el lugar de la implantación, es fundamental en el aseguramiento de una invasión citotrofoblástica. El complejo mayor de histocompatibilidad clase I no clásico, HLA-G, se expresa de manera exclusiva en el citotrofoblasto invasivo. En condiciones normales, HLA-G es sobre expresado, mientras que, en células preeclámpticas, su expresión disminuye de manera sustancial (McMaster et al., 1995).

Otros estudios han permitido determinar que, en algunos casos, la expresión de HLA-G se mantiene con normalidad durante el embarazo y es la alteración en la síntesis de sus receptores *KIR2DL4* y *LILRB1*, lo que conduce a procesos de invasión placentaria alterada (Rajagopalan & Long, 1999).

Al igual que las moléculas involucradas en procesos inmunológicos, la desregulación de factores angiogénicos y vasculogénicos también ha sido implicada en la aparición de la PE. Por ejemplo, en mujeres con esta enfermedad, el receptor soluble del factor de crecimiento endotelial vascular (sFLT1), encargado de interactuar tanto con este ligando como con la endoglina, un factor de crecimiento transformante alfa, se encuentra en concentraciones elevadas en plasma, mientras que, por el contrario, los niveles del factor de crecimiento placentario (PLGF) se encuentran disminuidos. Se ha demostrado que la simulación en modelos murinos de un ambiente molecular plasmático como el descrito, conduce a la aparición de síndromes preeclámpticos, compuestos por proteinuria y falla renal, comprobando así la importancia de este desbalance angiogénico durante la PE (Chaiworapongsa et al., 2014; Maynard, Epstein, & Karumanchi, 2008).

Es importante resaltar que el comportamiento plasmático de estas moléculas, también ha sido asociado a la severidad con la que se manifiesta la enfermedad. Análisis con microarreglos han permitido observar que los RNA mensajeros de estas proteínas duplican su concentración en mujeres con criterios de severidad al ser comparados con mujeres afectadas por PE no severa (Winn, Gormley, & Fisher, 2011).

Con el objetivo de extrapolar estos hallazgos de modelos murinos a la especie humana, Sitras y colaboradores, analizaron los perfiles de expresión génica en placentas de mujeres con PE severa. A través de microarreglos encontraron 213 genes sobreexpresados y 82 con baja expresión al ser comparados con placentas

sanas. Dentro de estos, algunos ya habían sido reportados previamente por otros grupos de investigación, lo que reforzó los hallazgos. Dentro de este subgrupo, resaltaron la diferencia en expresión de la leptina, *hCG*, *VEGF*, *IGF2* y *MMP2* (Sitras et al., 2009).

A pesar de ser un tema menos estudiado, el tejido endometrial anómalo, su vasculatura y los perfiles de expresión molecular por parte de las células que lo constituyen, también han sido relacionados con el desarrollo de PE. Esto permite sugerir, que el componente genético tanto de la madre como de la placenta son esenciales. Se ha definido que la interacción fallida entre la vasculatura materna y el citotrofoblasto es la expresión temprana de una enfermedad cardiovascular latente. Se ha descrito que mujeres que presentan PE durante el embarazo, años después del suceso, manifiestan enfermedades del sistema cardiovascular, como la cardiopatía dilatada o la hipertrofia ventricular concéntrica. Además, mujeres con antecedente de hipertensión presentan con mayor frecuencia PE (Chen, Jaffe, & Karumanchi, 2014; Ducat et al., 2016).

Con respecto a grupos celulares específicos, defectos moleculares en la decidua han sido descritos durante estadios tempranos de la gestación. Por ejemplo, se ha visto que la sobre expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en la decidua de modelos murinos, conduce a la aparición de síndromes preeclámpticos, como los ya descritos (Rabaglino, Post Uiterweer, Jeyabalan, Hogge, & Conrad, 2015).

Como se mencionó de manera previa, durante la PE, están involucrados los genomas de la madre, el padre, así como el fetal. Esto ha sido estudiado entre otros, mediante el apareamiento de hembras transgénicas con sobreexpresión de angiotensinogéno con machos con niveles elevados de renina, lo que condujo a que las madres experimentaran hipertensión y proteinuria que resolvían espontáneamente después del parto, así como a cambios histopatológicos de daño placentario, nefritis glomerular e hipertrofia miocárdica (Takimoto et al., 1996).

No solo la sobreexpresión de moléculas en modelos animales ha sido asociada a la PE. Ratones en gestación, con una pobre expresión de catecol-O-metiltransferasa, también presentan síndromes preeclámpticos atribuibles al déficit de metoxiestradiol, una molécula encargada de inhibir la angiogénesis (Kanasaki et al., 2008). Un ejemplo adicional es el de la corina, una enzima convertidora del péptido natriurético auricular, que promueve la invasión trofoblástica y la remodelación de arterias espiraladas; una falta de expresión de la corina en modelos murinos resultó en el desarrollo del síndrome preeclámptico (Cui et al., 2012). Sucede algo parecido con la metaloproteinasa 9, ratones con expresión nula de esta proteína manifestarán características similares tanto de PE como de RCIU, probablemente porque ocurre una invasión fallida del trofoblasto (Plaks et al., 2013).

La reducción en la perfusión de las arterias uterinas ha sido definida como una de las causas de aparición de PE. En 1940, Ogden y Page por medio del aprisionamiento de la aorta abdominal en perras embarazadas lograron simular los síntomas de la enfermedad y una invasión trofoblástica anormal más allá del

miometrio (Ogden, Hildebrand, & Page, 1940). De manera reciente, otros grupos de investigación han replicado este trabajo en distintos modelos animales como, por ejemplo, el orangután, obteniendo resultados similares (Bdolah et al., 2005). Esto, ha conducido a que tanto la hipoxia, como las rutas moleculares que participan en ésta y su expresión aberrante, sean asociadas con la PE. Se ha descrito que células tumorales y endoteliales de mamífero expresan proteínas para asegurar una invasión tisular en condiciones de hipoxia. Rajakumar y colaboradores, analizaron la expresión del factor inducible de hipoxia (HIF) en células de placentas afectadas, encontrando que la expresión proteica de HIF-2 α , pero no de HIF-1 α o 1 β , estaba aumentada de manera selectiva en las placentas preeclámpticas, y no volvía a concentraciones normales incluso cuando los niveles de oxígeno eran restaurados. Tanto *FLT1* como *VEGF*, son genes inducidos por HIF y, por lo tanto, también fueron encontrados en niveles elevados en las placentas preeclámpticas (Bdolah et al., 2005).

El momento de la manifestación de la PE, temprana (antes de las 34 semanas) o tardía (después de las 34 semanas), han sido catalogados como dos fenotipos que presentan una expresión de marcadores metabólicos distintos, así como desenlaces discrepantes. La activación o silenciamiento de algunos genes en el instante equivocado, podría asociarse a la manifestación en un momento diferente durante la gestación. Liang y colaboradores, a través de un estudio en donde utilizaron microarreglos y muestras placentarias de mujeres con PE temprana y tardía, encontraron que los perfiles de expresión no eran iguales. Por medio de este

trabajo, varios genes novedosos relacionados con procesos proinflamatorios, neovascularización y la síntesis de receptores de membrana asociados a proteínas G fueron identificados en niveles de sobreexpresión al ser comparados entre pacientes con PE temprana y tardía. Algunos de estos fueron *TNFSF10*, *PRG2*, *PLA2G7*, *S100A8*, *AOC3*, *ANGPT2*, *GPR124*, *GREM2* (Liang et al., 2016).

De acuerdo a lo descrito hasta el momento, la regulación de las moléculas de remodelación arterial, la neovascularización, la inmunomodulación y la hipoxia, representa un factor clave que, de verse afectada, puede contribuir con la aparición de la PE.

2.5 ESTUDIOS GENÉTICOS DE LA PREECLAMPSIA

La compleja participación de múltiples moléculas durante el desarrollo de la PE, así como el estudio de la historia familiar como un factor de riesgo claro para sufrir la enfermedad, han demostrado que existe un componente genético importante alrededor de la patología. Numerosos grupos de investigación a través de diversas técnicas de laboratorio, han procurado determinar de manera precisa nuevas moléculas participantes, pues, la comprensión de las bases genéticas de la PE traería consigo tres importantes implicaciones: 1) la identificación de genes causales permitiría el desarrollo de biomarcadores clínicos útiles en la detección temprana de algunas mujeres con riesgo de padecer la enfermedad, lo que facilitaría una pronta intervención con un impacto importante en el desenlace 2) la comprensión de

nuevos mecanismo moleculares de la fisiopatología de la PE y 3) la intervención de algunas de éstas vías moleculares como blanco terapéutico.

A lo largo de este apartado, se presentarán los resultados de algunos trabajos de investigación desarrollados durante los últimos años, así como sus limitaciones y las perspectivas futuras que han surgido a partir de los mismos.

Si bien, el primer reporte de un grupo familiar con PE se realizó alrededor de 1870 (Chesley, Annitto, & Cosgrove, 1968), durante el siglo veinte, estudios poblacionales permitieron observar una clara transmisión de la enfermedad en diferentes generaciones de una misma familia, demostrando un potencial componente genético en esta enfermedad. Un estudio noruego, soportado en las bases de registro de nacimientos nacionales, concluyó que las hijas de madres preeclámpticas tenían 2.2 veces mayor riesgo de presentar la enfermedad, e incluso, aquellas mujeres con madres sanas, al tener hermanas con antecedente de la enfermedad también presentaban un riesgo duplicado (Skjaerven et al., 2005). Un resultado similar, fue publicado por un grupo de investigación canadiense que, siguiendo una metodología análoga a la anterior, encontró un riesgo tres veces mayor en aquellas mujeres con algún antecedente familiar (Dawson et al., 2002). Es importante resaltar que también existe evidencia relacionada con la contribución de los factores genéticos del padre a la enfermedad. Así como sucede con las mujeres, aquellos hombres hijos de madres con antecedente de PE durante la gestación, tienen mayor riesgo de tener la paternidad de un embarazo

preeclámptico y de repetir el episodio, incluso al cambiar de pareja (Cnattingius, Reilly, Pawitan, & Lichtenstein, 2004).

Con el objetivo de determinar la distribución del aporte de los factores genéticos de la madre, el padre y el feto al desarrollo de la enfermedad, Cnattingius y colaboradores, realizaron un estudio poblacional en Suecia, que reunió 244,564 parejas de hermanos con 701,488 embarazos, encontrando, por medio de un análisis estadístico y la aplicación de un modelo lineal generalizado mixto, que la variabilidad en el origen aparente de la PE correspondía en un 35% a factores maternos, 20% a los fetales, 13% a los de pareja, menos del 1% a los ambientales y el 32% restante a factores no medibles (Cnattingius et al., 2004). Lo anterior, convierte a los factores genéticos de la madre y el feto en un blanco interesante de investigación pues en conjunto representan el 55% de la variabilidad. Estos factores al encontrarse reunidos en la placenta, hacen de este tipo de tejido una excelente muestra biológica para el desarrollo de trabajos de investigación relacionados con la PE.

Partiendo de este punto, y teniendo en cuenta que los estudios de genes candidato habían arrojado, hasta el momento, resultados inconsistentes, varios grupos de investigación ejecutaron abordajes de mapeo sobre todo el genoma que les permitieran la identificación de regiones cromosómicas portadoras de genes potencialmente involucrados en la fisiopatología de la enfermedad. Lo anterior, se focalizó en la aplicación de dos tipos de estudios: Ligamiento y asociación, los

cuales buscaban, partiendo de diferentes metodologías, la identificación de *loci* genéticos relacionados con el fenotipo (Glotov et al., 2018).

Estos tipos de trabajos se han realizado en diferentes países del mundo, como: Nueva Zelanda, Finlandia, Islandia, Noruega, el Reino Unido, Estados Unidos y Holanda (Tabla 1). Uno de los primeros estudios de ligamiento alrededor de esta patología fue publicado en 1992 y desarrollado en el Reino Unido (Hayward, Livingstone, Holloway, Liston, & Brock, 1992). Se analizaron 43 *loci* distribuidos en 21 de los 23 cromosomas en 35 familias que contaran con al menos dos personas afectadas por PE. Los resultados sugirieron que el gen relacionado con esta enfermedad posiblemente se encontraba en los cromosomas 1, 3, 9 o 18; sin embargo, tiempo después se consideró que las asociaciones reportadas eran inconclusas o no significativas (Hayward et al., 1992). Un par de años después, Guo y Harrison junto con sus equipos de trabajo, describieron, respectivamente, un posible ligamiento en las regiones 4q (Harrison et al., 1997) y 7q36 (Guo et al., 1999) en población australiana y neozelandesa; desafortunadamente, y como sucedió con la investigación adelantada por Hayward, sus conclusiones no tuvieron la validez y el impacto esperado.

Tabla 1. Trabajos de investigación asociados al estudio molecular de la PE

ORIGEN DE LA POBLACIÓN	TIPO DE ESTUDIO	TAMAÑO DE MUESTRA	RESULTADOS	REFERENCIA
Inglaterra	Ligamiento	35 familias	Cromosoma 1, 3, 9, 18	Hayward et al, 1992
Australia	Ligamiento	15 familias	4q	Harrison et al, 1997
Australia	Ligamiento	26 familias	7q36	Guo et al, 1999
Australia / Nueva Zelanda	Ligamiento	34 familias	2q21.1 - 2q.24.1	Moses et al, 2000
Australia / Nueva Zelanda	Ligamiento	34 familias	5q, 13q	Johnson et al, 2007
Holanda	Ligamiento	24 familias	STOX1, p.Tyr153His	van Dijk et al, 2005
Noruega	Asociación	3537 individuos no relacionados	ACVR, 2q22	Roten et al, 2009

Se ha considerado que la imposibilidad de replicación de estos resultados es, en parte, debido a los diferentes modelos utilizados para el análisis de los datos de ligamiento y a los criterios de selección aplicados al momento de llevar a cabo la recolección de pacientes, lo cual está relacionado con la definición misma de PE vigente en cada momento (Harrison et al., 1997). Otros investigadores han manifestado que la debilidad en las señales de ligamiento emitidas en estos estudios y el número relativamente pequeño de familias y hermanos afectados, fueron otros elementos que no permitieron posicionar adecuadamente los resultados obtenidos (Dempfle & Loesgen, 2004).

Producto de la gran cantidad de regiones cromosómicas identificadas por diversos grupos de investigación y con el objetivo de sumar los esfuerzos de los escaneos al genoma anteriores, en 2006, Zintzaras y colaboradores realizaron un meta-análisis que reunió los estudios de ligamiento en torno a la pre-eclampsia publicados hasta diciembre de 2005. Su investigación, no sólo permitió aumentar los tamaños de muestra de los estudios previos, así como su poder estadístico, sino que confirmó, por medio de análisis bioestadísticos, siete de las regiones ya descritas en los cromosomas 2, 4, 9 y 15. Dentro de estas regiones se encontraban ubicados genes como: *CTLA-4*, *INHA*, *IL1B*, *NOS3*, entre otros (Zintzaras et al., 2006).

Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación y genotipificación, los resultados arrojados por los estudios de asociación y ligamiento con el tiempo fueron adquiriendo mayor confiabilidad al interior de la comunidad académica. Es así como nuevas regiones cromosómicas fueron reportadas por diversos grupos de investigación en los años siguientes. Dentro de las más importantes, se encuentra el locus *PREG1* (por su nombre en inglés *pre-eclampsia, eclampsia, gene 1*), ubicado en el cromosoma 2, descrito por Moses y colaboradores en el año 2000. Lo anterior, fue posible gracias a un estudio de ligamiento implementado en 34 familias provenientes de Australia y Nueva Zelanda que contenían dentro de su árbol genealógico un total de 121 mujeres afectadas por PE. Estos resultados fueron concordantes con un trabajo previo desarrollado en población islandesa lo que permitió que adquirieran gran relevancia al interior de la comunidad académica (Moses et al., 2000). Posterior a esto, un mapeo detallado de la región y el análisis

de SNP ubicados en *PREG1* permitió la identificación de genes candidato de gran significancia: *TACR1*, *TCF7L1* y *ACVR2A*, asociaciones de SNPs con el fenotipo de este último gen han sido encontradas en estudios noruegos de casos y controles no relacionados familiarmente (Roten et al., 2009).

Como en el caso de *PREG1*, la identificación de loci de rasgos cuantitativos en los cromosomas 5q y 13q (QTL, por sus siglas en inglés), reveló varios genes candidato relacionados con el desarrollo de PE, así como SNPs de susceptibilidad. Algunos de estos genes fueron: *CRHBP*, *ERAP1*, *LNPEP*, *COL4A1* y *COL4A2* (Johnson et al., 2007).

Van Dijk y colaboradores en 2005, secuenciaron 17 genes ubicados en una región candidata (10q22) con el objetivo de identificar variaciones nucleotídicas entre las hermanas preeclámpticas pertenecientes a 8 familias holandesas distintas. Lo anterior, les permitió describir en el gen *STOX1* cinco mutaciones missense. Entre ellas, p.Tyr153His, es particular interés ya que esta posición un aminoácido altamente conservado, se encontraba mutado en todas las hermanas afectadas y contaba con una clara transmisión matrilineal (van Dijk et al., 2005). *STOX1* es un factor de transcripción que participa en la diferenciación trofoblástica durante la invasión al endometrio y se encuentra sobre expresado en las placentas de mujeres con PE. Estudios funcionales realizados en ratones transgénicos con sobre expresión del gen, mostraron que los animales desarrollaban síndromes preeclámpticos durante la gestación presentando cambios micro y macroscópicos a nivel de corazón (Ducat et al., 2016). Desafortunadamente, la asociación genética

reportada por van Dijk no pudo ser replicada en población finlandesa y noruega, y la mutación missense no daba explicación a la alta expresión de esta proteína en las mujeres afectadas por la patología.

Entendiendo que la PE es una enfermedad compleja en donde interactúan cientos de moléculas a nivel de diversos grupos celulares, la búsqueda a gran escala a partir del análisis simultáneo de diversos genes, es un abordaje coherente.

En este marco, en el presente trabajo de tesis, se realizó una aproximación novedosa utilizando secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) y el análisis de un subset de 386 genes candidato, seleccionados a partir de la evidencia científica reportada en la literatura.

2.6 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN – NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

El término secuenciación de siguiente generación (NGS), se refiere a un grupo de plataformas tecnológicas con diversos mecanismos de funcionamiento, que en común permiten determinar, eficientemente, la secuencia nucleotídica de grandes regiones del genoma. En algunos casos, y dependiendo de los intereses específicos del investigador, puede dirigirse únicamente hacia un subset de genes, el exoma, o como ya se mencionó de manera previa, al genoma en su totalidad.

Durante los últimos años, el número de plataformas NGS ha aumentado de manera considerable. Illumina, Applied Biosystems SOLiD System, 454 Life Sciences (Roche), Helicos HeliScope, Complete Genomics, Pacific Biosciences PacBio and

Life Technologies Ion Torrent, son algunos ejemplos. De manera reciente, se habla de una secuenciación de “tercera generación” que funciona a través de nanoporos; sin embargo, no se desarrollará durante este apartado (Bahassi & Stambrook, 2014).

La mayoría de plataformas utilizan, por lo general, protocolos similares. Fases como la preparación de librerías, la secuenciación de los ácidos nucleicos, la entrega y el análisis de los resultados, suelen converger en algunos puntos (Bahassi & Stambrook, 2014).

2.6.1 Preparación de librerías para NGS

Durante esta fase se construye y amplifica la librería de ácidos nucleicos. Para esto, el ADN debe ser fragmentado y ligado en su extremo terminal a unos adaptadores (secuencia universal de nucleótidos sintéticos). Una vez armadas, y debido a que la mayoría de sistemas no son capaces de detectar señales de baja fluorescencia, estas librerías deben ser amplificadas por PCR como un paso previo a la secuenciación.

Dependiendo de la plataforma, la técnica de amplificación clonal puede variar. Una opción es hacerlo a través de emulsión (emPCR), la cual fija el ADN a adaptadores ubicados en la superficie de microperlas. El complejo microperla - ADN es encapsulado en gotas de solución acuosa de aceite, en donde ocurre la amplificación del material genético. Finalizado este proceso, se procede a ligar

químicamente las gotas a una superficie vidriosa o a diversos pozos individuales de una placa o un gel de poliacrilamida (Berglund, Kiiialainen, & Syvänen, 2011).

Sí por el contrario, la amplificación se hace por medio de base sólida, o en puente, el ADN debe ser fragmentado, separado en cadena sencilla y fijado a una plataforma sólida que contiene *primers* tanto forward como reverse. Cada uno de los fragmentos de ADN se unirá a la plataforma a través de unos oligonucleótidos universales adaptados a su extremo libre y buscará su secuencia complementaria adyacente. A partir de este momento ocurrirá la amplificación clonal de los fragmentos, dando como resultado entre 100 y 200 millones de copias (Berglund et al., 2011).

2.6.2 Secuenciación-NGS

Una vez amplificados los fragmentos de ADN se debe proceder a su secuenciación.

Al igual que como sucede con la fase anterior, existen diferentes metodologías para desarrollar esta etapa. Una de estas es la secuenciación por síntesis en la cual los fragmentos amplificados son utilizados como hebras molde, a partir de las cuales, se sintetizan nuevas cadenas que determinan la secuencia nucleotídica. Para lo anterior, se realiza un proceso de lavado y enriquecimiento con nucleótidos conocidos en un orden secuencial. Cada vez que un nucleótido es incorporado en la hebra naciente, ocurre un registro digital del mismo. El método de detección varía ligeramente dependiendo de la plataforma que se esté utilizando, el cual podrá estar

fundamentado en la percepción de los hidrogeniones liberados o en la fluorescencia emitida producto de la adición de los nucleótidos marcados (Quail et al., 2012).

Esta fase también se puede realizar por medio de la secuenciación en tiempo real. Para esta técnica se utilizan polimerasas con detectores ZMW (Zero Mode Waveguide) adheridos a su superficie, que contienen nucleótidos marcados fluorescentemente con gamma-fosfato. Durante la incorporación de cada nucleótido los detectores censan los pulsos de fluorescencia emitidos de manera inmediata y generando así la secuencia de cada fragmento (Quail et al., 2012).

2.6.3 Análisis de datos derivados de NGS

Una vez la secuenciación está completa, un gran volumen de datos sin procesar debe someterse a varios niveles de análisis. Como primera medida, corresponde depurar los datos, es decir que las secuencias arrojadas por los adaptadores y las lecturas de baja calidad deben ser eliminadas. Luego, se procede a realizar un alineamiento de los fragmentos secuenciados, que bien puede hacerse sobre una secuencia de referencia o a través de una reconstrucción *de novo*. Completados estos dos estadios, diferentes análisis bioinformáticos se implementan sobre el material obtenido: “*genetic variant calling*” para detección de variantes de nucleótido simple, deleciones o inserciones, identificación de nuevos genes o elementos regulatorios, evaluación de niveles de expresión, son algunas de estas (Trapnell & Salzberg, 2009).

Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del Centro de Investigación en Genética y Genómica de la Universidad del Rosario fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el trabajo presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017, 2018; Castro et al., 2013; Delcour et al., 2018; Diggle et al., 2012; Ducat et al., 2016; D. J. Fonseca et al., 2013; Dora Janeth Fonseca, Garzón, et al., 2012; Dora Janeth Fonseca, Ojeda, et al., 2012; Dora Janeth Fonseca et al., 2014, 2015; Dora Janeth Fonseca, Prada, et al., 2012; Forero et al., 2016; Galvez et al., 2018; Laissue, 2015, 2018; Laissue, Burgio, et al., 2009; Laissue, Lakhal, et al., 2009, p. 2; Laissue et al., 2016; Laissue, Restrepo, & Ortiz, 2017; Laissue, L'hôte, Serres, & Vaiman, 2009; B. Lakhal, Laissue, Elghèzal, & Fellous, 2008; Besma Lakhal et al., 2009, 2010; L'Hôte et al., 2010; Mateus et al., 2017; Miranda-Fernández et al., 2018; Mitropoulos et al., 2015; Niño et al., 2013; Ojeda et al., 2011; O. Ortega-Recalde, Beltrán, et al., 2015; O. Ortega-Recalde, Moreno, et al., 2015; O. Ortega-Recalde, Silgado, Fetiva, Fonseca, & Laissue, 2016; Oscar Ortega-Recalde et al., 2013, 2014; Liliana C. Patiño et al., 2019, 2017; Liliana Catherine Patiño et al., 2014; Liliana Catherine Patiño, Beau, et al., 2017; Liliana Catherine Patiño, Silgado, & Laissue, 2017; Prada & Laissue, 2014; Quintero-Ronderos & Laissue, 2018; Quintero-Ronderos, Mercier, Fukuda, et al., 2017; Quintero-Ronderos, Mercier, Gris, et al., 2017; Valero-Rubio, Jiménez, Fonseca, Payán-Gómez, & Laissue, 2018; Vatin et al., 2014, 2012)

3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Es posible identificar por medio de secuenciación de siguiente generación nuevos genes y variantes candidatas potencialmente asociados con la etiología de la preeclampsia?

4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar nuevos genes y variantes candidatos que puedan ser utilizados en un futuro como marcadores genéticos para el diagnóstico temprano y la potencial prevención de la preeclampsia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el análisis de los datos genómicos mediante la aplicación sistemática de rigurosos filtros computacionales para la selección de variantes candidatas.
- Determinar si la secuenciación de siguiente generación es un abordaje eficiente para el estudio y la potencial identificación de nuevos actores moleculares etiológicos de la preeclampsia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 POBLACIÓN EN ESTUDIO

Un total de 60 pacientes, caucásicas, mayores de 18 años, diagnosticadas con PE (n = 49) o RCIU (n = 11), y atendidas por el servicio de Ginecología y Obstetricia del Instituto Cochin en Francia hicieron parte de este estudio.

Para realizar el diagnóstico de PE, se utilizaron los parámetros definidos por el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG, por sus siglas en inglés):

- Tensión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg y/o diastólica mayor o igual a 90 mmHg, en dos tomas separadas por al menos 4 horas, después de la semana 20 de gestación.
- Proteinuria mayor o igual a 300 mg en una recolección de orina de 24 horas o una relación proteína/creatinina mayor a 0.3.

O, en ausencia de proteinuria, presencia de cualquiera de los siguientes criterios acompañado de hipertensión acorde con los valores ya mencionados:

- Trombocitopenia menor a 100,000 plaquetas por microlitro
- Creatinina mayor a 1.1 mg/dL.
- Elevación de las transaminasas dos veces por encima del valor de referencia.
- Elevación de la creatinina sérica dos veces por encima del valor de referencia sin historia clínica previa de falla renal.
- Edema pulmonar, alteraciones visuales o cerebrales.

Aquellas pacientes con cifras de tensión arterial sistólica mayor o igual a 160 mmHg o diastólica mayor o igual a 110 mmHg, fueron asignadas al grupo de “preeclampsia severa”.

De igual manera, para el diagnóstico de RCIU fueron utilizados los criterios diagnósticos de la ACOG:

- Peso fetal por debajo del percentil 10 para la edad gestacional.

Se obtuvo un consentimiento informado de cada una de las participantes, quienes autorizaron la toma de muestras de tejido placentario, así como el acceso y uso de sus datos personales con fines investigativos. Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Cochin y desarrollado de acuerdo a lo estipulado por la declaración de Helsinki.

5.2 RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ADN PLACENTARIO

Una vez finalizado el trabajo de parto, las placentas fueron recolectadas y lavadas con solución salina, con el objetivo de retirar material biológico materno y membranas amnióticas. Se diseccionó 1 cm de la porción fetal de cada una de las placentas. A partir de estas muestras, se realizó la extracción de ADN genómico utilizando la técnica convencional de “*salting out*”. La concentración y la calidad de las muestras fueron determinadas por medio de espectrofotometría.

Las muestras de ADN fueron incluidas en un repositorio bajo la supervisión del Doctor Daniel Vaiman, investigador del Instituto Cochin, quien autorizó la utilización de las mismas para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

5.3 PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA Y SECUENCIACIÓN NGS

La totalidad de muestras de ADN placentario recolectadas fueron utilizadas para secuenciación por NGS (n= 60).

El subset de genes secuenciados se determinó a partir de genes candidato relacionados con procesos fisiopatológicos de la PE (remodelación vascular, invasión trofoblástica, inmunomodulación, entre otros) que contaran con evidencia científica publicada. Su selección fue producto de una revisión de la literatura en las bases de datos PubMed, Gioprofiles y MGI Jackson Laboratory. Los algoritmos de búsqueda incluyeron los términos MeSH “pre-eclampsia”, “pregnancy-induced hypertension”, “disease animal models”, “candidate gene analysis”, “genetics” y se consideraron únicamente aquellos trabajos originales o de experimentación. Lo anterior, permitió seleccionar 409 genes; sin embargo, por particularidades técnicas en la cobertura de la plataforma utilizada, se eliminaron 23 de estos, para un total final de 386 genes (Anexo 1).

Para la preparación de la librería y la secuenciación se utilizó el kit SureSelectXT. Entre 250 ng y 1 µg de ADN genómico extraído de cada una de las muestras fue fragmentado a un tamaño promedio de 300 pares de bases. El ADN fue sometido a una serie de reacciones enzimáticas para reparar los extremos esquilados, agregando un nucleótido de adenina y ligando los adaptadores. Las sondas fueron hibridadas a 16 librerías distintas y enriquecidas por medio de amplificación por PCR para los blancos especificados. La secuenciación se realizó a través de un equipo Illumina HiSeq 3000.

Las lecturas primarias fueron sometidas a diferentes filtros con el objetivo de mantener únicamente aquellas de “alta calidad”. Solo las que cumplieran en su totalidad con estos parámetros se sometieron a análisis posteriores. Estas lecturas se alinearon contra el genoma de referencia GCF_000001405.36_GRCh38.p10_genomic.fna por medio del software *MOSAIK*. Las variantes detectadas se filtraron a través de *VCFTOOLS* y la predicción de su potencial efecto patogénico se hizo con *Polyphen* y *SIFT*. La preparación de la librería y la secuenciación del ADN se desarrolló en las instalaciones de Rapid-Genomics (Estados Unidos).

5.4 ALGORITMO DE SELECCIÓN DE VARIANTES CANDIDATAS

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de la aplicación de diferentes filtros. Como primera medida, se tuvieron en cuenta aquellas variantes con una frecuencia alélica mínima (MAF, por sus siglas en inglés), menor a 0,01 (1%). Posteriormente, se seleccionaron las variantes no sinónimas (*missense*, *nonsense*, *splice region*, *frameshift*). Por último, se incluyeron las variantes que indicaran potenciales efectos deletéreos (patogénico, posiblemente patogénico) de acuerdo con los programas computacionales de predicción *SIFT* y *Polyphen*.

5.5 CONFIRMACIÓN DE VARIANTES POR SECUENCIACIÓN DE SANGER

Se realizó, a través de secuenciación de Sanger, la confirmación de aquellas variantes que cumplieran con los filtros de selección descritos previamente. El diseño de los primers se hizo utilizando el software *Primer3*, el cual considera dentro

de sus parámetros de construcción la temperatura de *melting*, el porcentaje de citosinas y guaninas, la formación de estructuras secundarias y dímeros, entre otros. La verificación de un adecuado diseño de primers se realizó por medio de *BLAST*, buscando ausencia de homología con otras regiones del genoma (Tabla 2).

Tabla 2. Primers de secuenciación para variantes candidatas

GEN	EXON	NOMBRE	SECUENCIA DEL PRIMER
<i>TGFB2</i>	4	hTGFB2_e04_1F	acacttggtcttatggttctctgca
		hTGFB2_e04_1R	AAAAGTGCAGCAGGGACAGTGTAAG
		hTGFB2_e04_Seq1F	ctatactacagtagagctaaatttag
<i>AGT</i>	2	hAGT_e02_1F	ttattctgggctaaatggtgacagg
		hAGT_e02_1R	ACTTGTCTTCGGTGTCAAGTTTTGC
		hAGT_e02_Seq1F	cttaaaggcagttaataaccacc
<i>HTRA3</i>	4	hHTRA3_e04_1F	agctgagcctctgttccgtgtact
		hHTRA3_e04_1R	ttctagcaagtggatgtgtcgagtg
		hHTRA3_e04_seq1F	ctttgcacagatgtgcatgcctcc
<i>TTN</i>	23	hTTN_e23_1F	TGGAGAAGAAAAGATGGCAGTTGAC
		hTTN_e23_1R	ttggtgttgccaatgtaagtttct
		hTTN_e23_Seq1F	GAATCTGAAGCTGTTGAATCAGG
<i>PDGFRA</i>	3	hPDGFRA_e03_1F	gctgttataatgggggagctttcat
		hPDGFRA_e03_1R	aagagaagaagcttggtcctggaga
		hPDGFRA_e03_Seq1F	GGCTGAGCCTAATCCTCTGCC
<i>TET2</i>	3	hTET2_e03_1F	TTGGCCAGACTAAAGTGGAAGAATG
		hTET2_e03_1R	TTGCTTCTGTAAGAGATGCCACCTT

		hTET2_e03_Seq1F	GAAAATCAGTATTCAAATCAAGCG
<i>VCAN</i>	7	hVCAN_e07_1F	GTGGGGATGAATGGAAAGGATAAAG
		hVCAN_e07_1R	TCTTTCCAAGGGAATTCTTCCTGAG
		hVCAN_e07_Seq1F	CATAGCAGCCCATGGAAAATTCAC
<i>TLR4</i>	3	hTLR4_e03_1F	agagcctatcattgcagccagtatg
		hTLR4_e03_1R	GAGATGTCCAATGGGGAAGTTCTCT
		hTLR4_e03_Seq1F	ctcagtctgtggggcttctatttg
<i>SIAE</i>	8	hSIAE_e08_1F	cactgccacaacagtaagaagctca
		hSIAE_e08_1R	aatcctcagtctaattgccctcac
		hSIAE_e08_Seq1F	catttaaatgcaatgagagaagcag
<i>IRAK4</i>	12	hIRAK4_e12_1F	agctaagattacagcattgcaccac
		hIRAK4_e12_1R	aaaatatgatgaacccacccttt
		hIRAK4_e12_Seq1F	ctgggtctcaattcttaataagg
<i>FOS</i>	4	hFOS_e4_1F	AGAAAAGGAGAATCCGAAGGGAAAG
		hFOS_e4_1R	GATGCTCTTGACAGGTTCCACTGAG
		hFOS_e4_Seq1F	ctctgtgggtgctccttttaaac
<i>TGFB3</i>	7	hTGFB3_e7_1F	ctggctcaaactcctgacctaag
		hTGFB3_e7_1R	CCTCTCAGTGAGGTTTGTGCTTGT
		hTGFB3_e7_Seq1F	cattctagcactgctcagcttctg
<i>LIPC</i>	8	hLIPC_e08_1F	aacactagttgggaaatgcagcaa
		hLIPC_e08_1R	tgtgtattcaaagacctgggtgtga
		hLIPC_e08_Seq1F	cccaagtcattcagggaaacacac
<i>ITGB3</i>	7	hITGB3_e07_1F	tagagatggggcttgctatgttgc
		hITGB3_e07_1R	aaaaggcccagagtgcaatcttag

		hITGB3_e07_Seq1F	ctcactttcagcatgaagtgaaatg
<i>MAN1C1</i>	12	hMAN1C1_e12_1F	aaactaagtccttctgaccccaaag
		hMAN1C1_e12_1R	CTCACAGAGGAAAAGAAGTTGCTTG
		hMAN1C1_e12_Seq1F	acaaaggccctgagactgttcca
<i>F5</i>	10	hF5_e10_1F	CAGTTCAACCAGGGGAAACCTATAC
		hF5_e10_1R	ctcaacacatccaataccaacagac
		hF5_e10_Seq1R	tgcttcggcagtgatggtactgat
<i>KDR</i>	11	hKDR_e11_1F	taagttcctgccttcttgaac
		hKDR_e11_1R	tgctcacatattattgtaccatcc
		hKDR_e11_Seq1F	gaatagctgcttccctctgtatcc
<i>ERAP1</i>	13	hERAP1_e13_1F	CAGAGATGTAGTTGCCATTCTTTTC
		hERAP1_e13_1R	TTCAGAAATAAACCGCGACTTTGTG
		hERAP1_e13_Seq1F	gtctattgagttgctgttttctgg

6. RESULTADOS

6.1 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN (NGS)

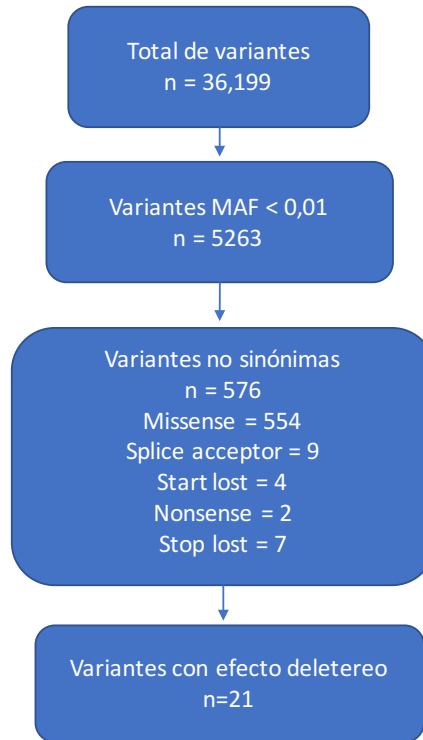
El promedio de cobertura obtenido para los 386 genes seleccionados fue del 69%. El porcentaje final fue relativamente bajo por la necesidad de exclusión de aquellas sondas con la capacidad de captar varias regiones del genoma hacia las cuales no se encontraban dirigidas.

La secuenciación de siguiente generación arrojó 36,199 variantes sobre el subset de genes en la totalidad de las muestras (n= 60). Es importante aclarar que en este punto del análisis es posible exista redundancia en el número de variantes detectadas debido a que son representativas de transcritos distintos.

El total de variantes se analizó por medio del algoritmo de selección descrito en el apartado previo (Figura 2), arrojando un total final de 21 variantes *missense*.

La validación de 18 de las 21 variantes fue realizada por medio de secuenciación de Sanger, confirmando la presencia de 14 de estas en 29 pacientes. Las 3 variantes restantes se encuentran en proceso de secuenciación y su resultado no fue incluido en el presente trabajo de tesis.

Figura 2. Resultados aplicación del algoritmo de selección de variantes



Todas las variantes se encontraron en estado heterocigoto, a excepción de c.805G>A, en el gen *HTRA3*, la cual estaba en estado homocigoto. Los diagnósticos de las pacientes con variantes candidatas pueden verse en la tabla 3, en donde PE corresponde a preeclampsia, R a restricción de crecimiento intrauterino y PER, preeclampsia asociada a restricción de crecimiento intrauterino.

Tabla 3. Variantes confirmadas por secuenciación de Sanger

GEN	PACIENTE	VARIANTE ADN	PROTEÍNA	RS	POLYPHEN	SIFT	PROCESO BIOLÓGICO
AGT	PT72 (R) PT195 (PE)	c.151T>C	p.Cys51Arg	rs61731497	Probablemente dañina (0.983)	Deleteera (0)	Angiogénesis
ERAP1	PT164 (PER) PT88 (PE) 7007 (PER)	c.1763T>G	p.Val588Gly	rs114703312	Probablemente dañina (0.448)	Deleteera (0.01)	Modulación de la función inmunológica
F5	PT222F1 (PE) PT222F2 (PE) PT81 (R) PT212 (PER)	c.1601G>A	p.Arg534Gln	rs6025	Probablemente dañina (0.95)	Deleteera (0)	Coagulación
FOS	PT171 (PE) PT165 (PE) PT130 (PER)	c.528G>C	p.Lys176Asn	rs138334429	Probablemente dañina (0.998)	Deleteera (0)	Proliferación y diferenciación celular
HTRA3	PT71 (PE) PT192 (PER) PT169 (PER)	c.805G>A	p.Val269Met	rs111620813	Probablemente dañina (0.987)	Deleteera (0.01)	Respuesta celular a factores de crecimiento
KDR	PT90 (PER) PT99 (R)	c.1444T>C	p.Cys482Arg	rs34231037	Probablemente dañina (0.999)	Deleteera (0)	Angiogénesis
LIPC	7007 (PER)	c.1226A>C	p.Asp409Ala	rs142036980	Probablemente dañina (0.936)	Deleteera (0)	Metabolismo
MAN1C1	PT162 (PE) PT142 (PER) PT81 (R)	c.1849G>A	p.Val617Met	rs79507311	Probablemente dañina (0.988)	Deleteera (0)	Glicosilación de proteínas
PDGFRA	PT215F1 (PE) PT215F2 (PE) PT212 (PER) PT224 (PE)	c.236G>A	p.Gly79Asp	rs36035373	Probablemente dañina (0.922)	Deleteera (0.01)	Coagulación
SIAE	PT219F1 (PE) PT219F2 (PE)	c.1046A>G	p.Tyr349Cys	rs749579541	Probablemente dañina (0.954)	Deleteera (0.01)	Metabolismo
TET2	PT74 (PER) PT246 (PE)	c.2599T>C	p.Tyr867His	rs144386291	Probablemente dañina (0.963)	Deleteera (0)	Glicosilación de proteínas
TGFB2	PT215F1 (PE) PT215F2 (PE)	c.703G>C	p.Val235Leu	rs10482810	Probablemente dañina (0.485)	Deleteera (0)	Proliferación y diferenciación celular
TGFB3	PT247F1 (PE) PT247F2 (PER)	c.1169A>T	p.Tyr390Phe	rs996297395	Probablemente dañina (1)	Deleteera (0)	Proliferación y diferenciación celular
VCAN	PT79 (PE) PT88 (PE)	c.2875A>T	p.Ser959Cys	rs78164236	Probablemente dañina (0.87)	Deleteera (0)	Proliferación y diferenciación celular

7. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis se fundamentó en la búsqueda de elementos para una mejor comprensión de la etiología molecular de la PE, a través de la secuenciación masiva de un grupo de 386 genes a partir de ADN placentario de 60 mujeres afectadas por la enfermedad. Considerando que esta patología es el resultado de una compleja combinación de factores genéticos tanto maternos como paternos, la selección de la muestra biológica utilizada (placenta) es ideal, pues proporciona información molecular y la representación alélica de ambos padres. Sobre este punto, es importante señalar que el presente estudio es innovador pues hasta la fecha no se han realizado abordajes a partir de este diseño en pacientes preeclámpticas.

En lo que respecta a la elaboración del subconjunto de genes para el análisis computacional, un adecuado proceso de selección de las moléculas depende de múltiples variables como: la disponibilidad en bases de datos públicas de investigaciones realizadas con anterioridad y el rigor científico aplicado al momento de estudiar estas asociaciones. Debido a que estas variables dependen en parte de la experiencia del experimentador, es posible que se no incluyeran valiosos candidatos relacionados con la enfermedad. Por otro lado, al tratarse de secuenciación de regiones codificantes, aquellas regiones no-codificantes con efecto importante en la expresión (*enhancers*), silenciamiento (*silencers*) o incluso en la estabilidad de los transcritos (5' UTR, 3' UTR) no fueron analizadas, dejando de lado información potencialmente relevante relacionada con la regulación de estas moléculas.

Es importante precisar que la pertinencia en la selección de variantes posiblemente patogénicas a través de herramientas bioinformáticas como SIFT y Polyphen es limitada pues, sí bien tienen en cuenta dentro de sus algoritmos elementos como la conservación de los aminoácidos, las bases de datos consultadas cuentan con secuencias incompletas y el método no considera la complejidad estructural de las proteínas. Por lo anterior, estudios funcionales de las variantes identificadas deben incluirse, en lo posible, en la metodología de este tipo de trabajos de investigación (Laissue, 2018).

Desde una perspectiva etiológica, es claro que en la actualidad no existe una variante genética única responsable de la mayoría de casos de PE, aunque es posible que diferentes variantes estén asociadas con varios “subconjuntos” de la enfermedad, por ejemplo, PE y RCIU (Williams & Broughton Pipkin, 2011). De manera particular, combinaciones específicas de genes (y sus variantes) disfuncionales pueden considerarse elementos primordiales en la patogénesis de la PE y la RCIU. Por esto, y debido a que la fisiopatología de ambas entidades converge en numerosas vías moleculares comunes consideramos coherente incluir pacientes afectadas por RCIU y PE.

La selección de los genes analizados se efectuó a partir de la evidencia científica publicada, relacionada con su participación en vías moleculares asociadas a los principales procesos fisiopatológicos de la enfermedad. Para el análisis de los datos obtenidos se implementaron rigurosos filtros que condujeran a la identificación de variantes candidatas con efectos teóricos deletéreos sobre el funcionamiento de la

proteína (MAF < 1%, mutaciones no sinónimas, predicción positiva *in silico* de acuerdo a PolyPhen y SIFT).

Si bien, durante muchos años, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS), fueron utilizados para la identificación de variantes relacionadas con enfermedades comunes bajo la teoría de “variante común, enfermedad común”, este tipo de análisis únicamente permitían la detección de polimorfismos con una frecuencia poblacional mayor al 5%. Además, los marcadores genéticos utilizados por esta metodología son útiles para el mapeo de regiones potencialmente implicadas con el fenotipo y rara vez implican un efecto funcional mayor. En este marco, el mapeo por GWAS de rasgo complejos, poligénicos y multifactoriales como la PE es particularmente complejo e ineficiente (Casals, Idaghdour, Hussin, & Awadalla, 2012). La teoría de “equilibrio mutación-selección” durante muchos años fue considerada una explicación a la existencia de un buen número de personas afectadas por enfermedades hereditarias con impactos importantes en la salud. De manera reciente, fue recatalogada como una hipótesis interesante para la comprensión de enfermedades comunes, en la cual un número de variantes *missense* con efectos leves a moderados debe coexistir en una población, contribuyendo al desarrollo del fenotipo de enfermedades comunes con un tipo de herencia compleja; es decir que es factible que algunas enfermedades comunes, como la PE, puedan ser causadas por una multitud de variantes alélicas raras (Kryukov, Pennacchio, & Sunyaev, 2007). En nuestro estudio, por consecuencia, se

incluyeron únicamente aquellas variantes con frecuencias alélicas mínimas menores al 1%.

Actualmente, la secuenciación de siguiente generación es abordable en términos técnicos y de costos, características que le han permitido posicionarse como una herramienta fundamental para el estudio de enfermedades complejas, como la PE (Laissue, 2018). Estudios pioneros, efectuados por nuestro grupo, han permitido identificar numerosos nuevos genes y variantes genéticas relacionados con otras patologías de la reproducción como la insuficiencia ovárica primaria y el aborto espontáneo recurrente (Laissue, 2018; Liliana Catherine Patiño, Beau, et al., 2017; Quintero-Ronderos & Laissue, 2018; Quintero-Ronderos, Mercier, Fukuda, et al., 2017). Además, mediante este enfoque hemos determinado un origen poligénico de estas patologías. Estos hallazgos son coherentes desde un punto de vista evolutivo, pues es esperable que los mecanismos moleculares (y las vías implicadas) estén conservados y tengan una redundancia funcional con el fin de preservar los procesos interespecíficos esenciales de la reproducción de los vertebrados.

El abordaje descrito previamente permitió identificar 14 variantes en 14 genes, participantes en diversos procesos biológicos: angiogénesis, coagulación, modulación de la función inmunológica y diferenciación celular. Éstas variantes se encontraron en el 51,6% de las pacientes, demostrando que la secuenciación de siguiente generación efectivamente es útil para la identificación de potenciales causas genéticas en enfermedades complejas.

Las pacientes PT88, PT81, PT215F1, PT215F2 y 7007 presentaron más de una variante en diferentes genes. Por ejemplo, en la participante 7007 se detectaron las mutaciones c.1763T>G y c.1226A>G en los genes *ERAP1* y *LIPC*, respectivamente. Este tipo de hallazgo no sólo sugiere un componente poligénico de la enfermedad sino también un posible efecto epistático de diferentes variantes que contribuyen con la etiología de esta patología.

Algunos de los genes con variantes identificadas en este trabajo, han sido previamente relacionados con la fisiopatología de la PE. Por ejemplo, Johnson y colaboradores, en un estudio de casos y de controles desarrollado en población noruega, encontraron asociación genética con los genes *ERAP2* y *ERAP1* (Johnson et al., 2009). Variantes patogénicas en *ERAP1* fueron halladas en tres de nuestras pacientes. El gen *ERAP1* codifica para una enzima que participa en la regulación de la presión de arterial a través del eje renina-angiotensina, así como en la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria, por medio del clivaje de los receptores de superficie celular para la interleucina 1, interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral, regulando de manera negativa su expresión. Alteraciones en su función pueden desatar perturbaciones en las vías de señalización en las cuales participa, constituyendo un importante elemento en la fisiopatología de la PE (Johnson et al., 2009).

El angiotensinógeno, codificado por el gen *AGT*, cumple una función importante en la regulación de la tensión arterial en el eje renina-angiotensina, al igual que *ERAP1*. Un meta análisis realizado por Inoue y colaboradores, identificó la variante

p.Met235Thr en el *AGT* como un factor que aumenta 1.6 veces el riesgo de desarrollar PE. Un polimorfismo funcional en este mismo gen, en donde se presenta un cambio de leucina por fenilalanina en el sitio activo de clivaje de la renina, fue reportado en asociación con PE severa (Inoue et al., 1995).

En un trabajo de investigación realizado por Jarvenpaa y colaboradores, se encontraron cambios en la expresión de genes en la placenta de mujeres con diagnóstico de PE. Al igual que en este trabajo, *PDGFRA* hizo parte de los resultados presentando una regulación negativa de su expresión al ser comparado con mujeres sanas. *PDGFRA* tiene una función importante en la activación plaquetaria, en la secreción de agonistas de los gránulos plaquetarios y en la agregación plaquetaria inducida por trombina (Jarvenpaa et al., 2007). *F5*, otro gen con variante potencialmente patogénica (p.Arg534Gln) codifica para una proteína denominada el “regulador central de la hemostasia”, pues funciona como un cofactor crítico en la actividad protrombinasa del factor Xa produciendo la activación de protrombina a trombina. Estas dos moléculas (*PDGFRA* y *F5*) llaman especialmente la atención pues la coagulación es otro proceso ampliamente relacionado con la fisiopatología de la PE, especialmente en aquellos casos con criterios de severidad o síndrome de HELLP (Fong et al., 2014).

Por último, a pesar de que la secuenciación de siguiente generación es, sin duda, una aproximación de gran valor para el abordaje y la comprensión de la importancia de variantes raras en la fisiopatología de enfermedades complejas, así como en la resolución de aspectos genómicos como la “heredabilidad perdida”, existen aún

importantes retos que deben ser superados alrededor de la adecuada interpretación de los datos obtenidos (Laissue, 2018; Liliana Catherine Patiño, Beau, et al., 2017). Los ensayos funcionales in vitro y/o in vivo son un paso obligado para la determinación definitiva de nuevos marcadores moleculares de uso clínico. Esta tesis permitió por consiguiente concluir una primera etapa hacia ese objetivo.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- La secuenciación de siguiente generación es un abordaje útil e innovador para el estudio de enfermedades complejas como la PE.
- Es posible que en un futuro las variantes identificadas puedan ser utilizadas como biomarcador diagnóstico y pronóstico de PE.
- Se debe validar mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*, como por ejemplo en modelos murinos transgénicos, las variantes identificadas en este trabajo.
- Otras investigaciones con tamaños de muestra aumentados y secuenciación de exoma o genoma completo resultan un ejercicio valioso para la identificación de nuevas mutaciones causales.

9. REFERENCIAS

- American College of Obstetricians and Gynecologists (Ed.). (2013). *Hypertension in pregnancy*. Washington, DC: American College of Obstetricians and Gynecologists. Recuperado de <https://www.acog.org/~media/Task%20Force%20and%20Work%20Group%20Reports/public/HypertensioninPregnancy.pdf>
- Bahassi, E. M., & Stambrook, P. J. (2014). Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis*, 29(5), 303–310. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu031>
- Bdolah, Y., Karumanchi, S. A., & Sachs, B. P. (2005). Recent advances in understanding of preeclampsia. *Croatian Medical Journal*, 46(5), 728–736.
- Berglund, E. C., Kiialainen, A., & Syvänen, A.-C. (2011). Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investigative Genetics*, 2, 23. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-23>
- Brinkman-Van der Linden, E. C. M., Hurtado-Ziola, N., Hayakawa, T., Wiggleton, L., Benirschke, K., Varki, A., & Varki, N. (2007). Human-specific expression of Siglec-6 in the placenta. *Glycobiology*, 17(9), 922–931. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm065>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2015). What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4 Suppl), S6.e1, S6-8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>
- Burton, G. J., Jauniaux, E., & Charnock-Jones, D. S. (2010). The influence of the intrauterine environment on human placental development. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2–3), 303–312. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082764gb>
- Caburet, S., Zavadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., ... Fellous, M. (2012). Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial Premature Ovarian Failure. *PloS One*, 7(3), e33412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033412>
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patiño, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue, P. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3161–3166.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx199>

- Carlosama, C., Patiño, L. C., Beau, I., Morel, A., Delemer, B., Young, J., ... Laissue, P. (2018). A novel mutation in KHDRBS1 in a patient affected by primary ovarian insufficiency. *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/10.1111/cen.13749>
- Casals, F., Idaghdour, Y., Hussin, J., & Awadalla, P. (2012). Next-generation sequencing approaches for genetic mapping of complex diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 248(1–2), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.12.017>
- Castro, T., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Forero, D., Restrepo, C. M., Talero, C., ... Laissue, P. (2013). Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 34(12), 2219–2222. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1569-4>
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*, 18(12), 1754–1767. <https://doi.org/10.1038/nm.3012>
- Chaabane, C., Coen, M., & Bochaton-Piallat, M.-L. (2014). Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. *Current Opinion in Lipidology*, 25(5), 374–379. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000113>
- Chaiworapongsa, T., Chaemsaihong, P., Yeo, L., & Romero, R. (2014). Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews. Nephrology*, 10(8), 466–480. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.102>
- Chen, C. W., Jaffe, I. Z., & Karumanchi, S. A. (2014). Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 101(4), 579–586. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu018>
- Chesley, L. C., Annitto, J. E., & Cosgrove, R. A. (1968). The familial factor in toxemia of pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 32(3), 303–311.
- Cnattingius, S., Reilly, M., Pawitan, Y., & Lichtenstein, P. (2004). Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 130A(4), 365–371. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30257>
- Cross, J. C. (2000). Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11(2), 105–113. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0156>

- Cui, Y., Wang, W., Dong, N., Lou, J., Srinivasan, D. K., Cheng, W., ... Wu, Q. (2012). Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature*, 484(7393), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature10897>
- Dawson, L. M., Parfrey, P. S., Hefferton, D., Dicks, E. L., Cooper, M. J., Young, D., & Marsden, P. A. (2002). Familial risk of preeclampsia in Newfoundland: a population-based study. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(7), 1901–1906.
- Delcour, C., Amazit, L., Patino, L. C., Magnin, F., Fagart, J., Delemer, B., ... Beau, I. (2018). ATG7 and ATG9A loss-of-function variants trigger autophagy impairment and ovarian failure. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0287-y>
- Dempfle, A., & Loesgen, S. (2004). Meta-analysis of linkage studies for complex diseases: an overview of methods and a simulation study. *Annals of Human Genetics*, 68(Pt 1), 69–83.
- Diggle, C. P., Parry, D. A., Logan, C. V., Laissue, P., Rivera, C., Restrepo, C. M., ... Bonthron, D. T. (2012). Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Human Mutation*, 33(8), 1175–1181. <https://doi.org/10.1002/humu.22111>
- Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Méhats, C., Vilotte, J.-L., Castille, J., ... Vaiman, D. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Scientific Reports*, 6, 19196. <https://doi.org/10.1038/srep19196>
- Fisher, S. J. (2015). Why is placentation abnormal in preeclampsia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4 Suppl), S115-122. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.042>
- Fong, F. M., Sahemey, M. K., Hamed, G., Eytayo, R., Yates, D., Kuan, V., ... Walton, R. T. (2014). Maternal genotype and severe preeclampsia: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 180(4), 335–345. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu151>
- Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Vergara, J. I., Ríos, X., Uribe, C., Chávez, L., ... Laissue, P. (2013). A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *The British Journal of Dermatology*, 168(2), 456–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11181.x>
- Fonseca, Dora Janeth, Garzón, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., ... Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian

- failure patients. *Reproductive Biomedicine Online*, 24(3), 339–341. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.11.017>
- Fonseca, Dora Janeth, Ojeda, D., Lakhal, B., Braham, R., Eggers, S., Turbitt, E., ... Laissue, P. (2012). CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 160(5), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.006>
- Fonseca, Dora Janeth, Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patiño, L. C., Bermúdez, O. M., ... Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reproductive Biomedicine Online*, 29(5), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.018>
- Fonseca, Dora Janeth, Patiño, L. C., Suárez, Y. C., de Jesús Rodríguez, A., Mateus, H. E., Jiménez, K. M., ... Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertility and Sterility*, 104(1), 154-162.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.016>
- Fonseca, Dora Janeth, Prada, C. F., Siza, L. M., Angel, D., Gomez, Y. M., Restrepo, C. M., ... Laissue, P. (2012). A de novo 14q12q13.3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 158A(3), 689–693. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35215>
- Forbes, K., & Westwood, M. (2010). Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *The Journal of Endocrinology*, 207(1), 1–16. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0174>
- Forero, D. A., Wonkam, A., Wang, W., Laissue, P., López-Correa, C., Fernández-López, J. C., ... Perry, G. (2016). Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries. *Journal of Medical Genetics*, 53(7), 438–440. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103631>
- Galvez, J. M., Restrepo, C. M., Contreras, N. C., Alvarado, C., Calderón-Ospina, C.-A., Peña, N., ... Fonseca, D. J. (2018). Creating and validating a warfarin pharmacogenetic dosing algorithm for Colombian patients. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 11, 169–178. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S170515>
- Glotov, A. S., Kazakov, S. V., Vashukova, E. S., Pakin, V. S., Danilova, M. M., Nasykhova, Y. A., ... Baranov, V. S. (2018). Targeted sequencing analysis of ACVR2A gene identifies novel risk variants associated with preeclampsia. *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, 1–7.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1449204>

Guo, G., Lade, J. A., Wilton, A. N., Moses, E. K., Grehan, M., Fu, Y., ... Brennecke, S. P. (1999). Genetic susceptibility to pre-eclampsia and chromosome 7q36. *Human Genetics*, 105(6), 641–647.

Harrison, G. A., Humphrey, K. E., Jones, N., Badenhop, R., Guo, G., Elakis, G., ... Cooper, D. W. (1997). A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *American Journal of Human Genetics*, 60(5), 1158–1167.

Hayward, C., Livingstone, J., Holloway, S., Liston, W. A., & Brock, D. J. (1992). An exclusion map for pre-eclampsia: assuming autosomal recessive inheritance. *American Journal of Human Genetics*, 50(4), 749–757.

Inoue, I., Rohrwasser, A., Helin, C., Jeunemaitre, X., Crain, P., Bohlender, J., ... Lalouel, J. M. (1995). A mutation of angiotensinogen in a patient with preeclampsia leads to altered kinetics of the renin-angiotensin system. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11430–11436.

Janatpour, M. J., Utset, M. F., Cross, J. C., Rossant, J., Dong, J., Israel, M. A., & Fisher, S. J. (1999). A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation. *Developmental Genetics*, 25(2), 146–157. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1999\)25:2<146::AID-DVG9>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:2<146::AID-DVG9>3.0.CO;2-K)

Jarvenpaa, J., Vuoristo, J. T., Savolainen, E.-R., Ukkola, O., Vaskivuo, T., & Ryyanen, M. (2007). Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 23(6), 351–355. <https://doi.org/10.1080/09513590701350291>

Johnson, M. P., Fitzpatrick, E., Dyer, T. D., Jowett, J. B. M., Brennecke, S. P., Blangero, J., & Moses, E. K. (2007). Identification of two novel quantitative trait loci for pre-eclampsia susceptibility on chromosomes 5q and 13q using a variance components-based linkage approach. *Molecular Human Reproduction*, 13(1), 61–67. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal095>

Johnson, Roten, L., Dyer, T., East, C., Forsmo, S., Blangero, J., ... Moses, E. K. (2009).

The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Human Genetics*, 126(5), 655–666. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0714-x>

Kanasaki, K., Palmsten, K., Sugimoto, H., Ahmad, S., Hamano, Y., Xie, L., ... Kalluri, R. (2008). Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature*, 453(7198), 1117–1121. <https://doi.org/10.1038/nature06951>

Kryukov, G. V., Pennacchio, L. A., & Sunyaev, S. R. (2007). Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *American Journal of Human Genetics*, 80(4), 727–739. <https://doi.org/10.1086/513473>

Laissue, P. (2015). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.005>

Laissue, P. (2018). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.021>

Laissue, P., Burgio, G., l'Hôte, D., Renault, G., Marchiol-Fournigault, C., Fradelizi, D., ... Vaiman, D. (2009). Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(4), 623–629. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082613pl>

Laissue, P., Lakhal, B., Benayoun, B. A., Dipietromaria, A., Braham, R., Elghezal, H., ... Veitia, R. A. (2009). Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *Journal of Medical Genetics*, 46(7), 455–457. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.065086>

Laissue, P., Lakhal, B., Vatin, M., Batista, F., Burgio, G., Mercier, E., ... Vaiman, D. (2016). Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biology*, 6(10). <https://doi.org/10.1098/rsob.160109>

Laissue, P., L'hôte, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 3(1), 55–71. <https://doi.org/10.1017/S1751731108003315>

- Laissue, P., Restrepo, C., & Ortiz, A. (2017). Improving the evaluation of milestones for students completing a clinical genetics elective. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 19(12). <https://doi.org/10.1038/gim.2017.62>
- Lakhal, B., Laissue, P., Elghèzal, H., & Fellous, M. (2008). [Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes]. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 36(9), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.07.002>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saâd, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2009). A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*, 71(5), 752–753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03571.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saâd, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010). BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms? *Clinical Endocrinology*, 72(3), 425–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03651.x>
- L'Hôte, D., Laissue, P., Serres, C., Montagutelli, X., Veitia, R. A., & Vaiman, D. (2010). Interspecific resources: a major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 32(2), 132–142. <https://doi.org/10.1002/bies.200900027>
- Liang, M., Niu, J., Zhang, L., Deng, H., Ma, J., Zhou, W., ... Chen, L. (2016). Gene expression profiling reveals different molecular patterns in G-protein coupled receptor signaling pathways between early- and late-onset preeclampsia. *Placenta*, 40, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.015>
- Maltepe, E., Bakardjiev, A. I., & Fisher, S. J. (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1016–1025. <https://doi.org/10.1172/JCI41211>
- Mateus, H. E., Pérez, A. M., Mesa, M. L., Escobar, G., Gálvez, J. M., Montaña, J. I., ... Laissue, P. (2017). A first description of the Colombian national registry for rare diseases. *BMC Research Notes*, 10(1), 514. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2840-1>
- Maynard, S., Epstein, F. H., & Karumanchi, S. A. (2008). Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annual Review of Medicine*, 59, 61–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.214058>

- McMaster, M. T., Librach, C. L., Zhou, Y., Lim, K. H., Janatpour, M. J., DeMars, R., ... Fisher, S. J. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(8), 3771–3778.
- Miranda-Fernández, M.-C., Ramírez-Oyaga, S., Restrepo, C. M., Huertas-Quiñones, V.-M., Barrera-Castañeda, M., Quero, R., ... Cabrera, R. (2018). Identification of a New Candidate Locus for Ebstein Anomaly in 1p36.2. *Molecular Syndromology*, 9(3), 164–169. <https://doi.org/10.1159/000488820>
- Mitropoulos, K., Al Jaibaji, H., Forero, D. A., Laissue, P., Wonkam, A., Lopez-Correa, C., ... Patrinos, G. P. (2015). Success stories in genomic medicine from resource-limited countries. *Human Genomics*, 9, 11. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0033-3>
- Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., & Markert, U. R. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*, 33(9), 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.009>
- Moses, E. K., Lade, J. A., Guo, G., Wilton, A. N., Grehan, M., Freed, K., ... Brennecke, S. P. (2000). A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1581–1585. <https://doi.org/10.1086/316888>
- Murthi, P., Kalionis, B., Cocquebert, M., Rajaraman, G., Chui, A., Keogh, R. J., ... Fournier, T. (2013). Homeobox genes and down-stream transcription factor PPAR γ in normal and pathological human placental development. *Placenta*, 34(4), 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.01.005>
- Niño, M. Y., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Kroos, M. A., Ospina, S. Y., Mejía, J. F., ... Laissue, P. (2013). Identification and Functional Characterization of GAA Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease. *JIMD Reports*, 7, 39–48. https://doi.org/10.1007/8904_2012_138
- Ogden, E., Hildebrand, G. J., & Page, E. W. (1940). Rise of Blood Pressure During Ischemia of the Gravid Uterus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 43(1), 49–51. <https://doi.org/10.3181/00379727-43-11091P>
- Ojeda, D., Lakhal, B., Fonseca, D. J., Braham, R., Landolsi, H., Mateus, H. E., ... Laissue, P. (2011). Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertility and Sterility*, 95(8), 2658-2660.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.045>

- Ortega-Recalde, O., Beltrán, O. I., Gálvez, J. M., Palma-Montero, A., Restrepo, C. M., Mateus, H. E., & Laissue, P. (2015). Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clinical Genetics*, *88*(4), e1-3. <https://doi.org/10.1111/cge.12634>
- Ortega-Recalde, O., Moreno, M. B., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Mosquera, H., ... Laissue, P. (2015). A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, *40*(7), 757–760. <https://doi.org/10.1111/ced.12627>
- Ortega-Recalde, O., Silgado, D., Fetiva, C., Fonseca, D. J., & Laissue, P. (2016). Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth-Macklin caused by a KRT1 mutation. *The British Journal of Dermatology*, *175*(6), 1372–1375. <https://doi.org/10.1111/bjd.14969>
- Ortega-Recalde, Oscar, Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Atuesta, J. J., Rivera-Nieto, C., Restrepo, C. M., ... Laissue, P. (2013). A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations. *Mitochondrion*, *13*(6), 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.03.010>
- Ortega-Recalde, Oscar, Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Ríos, X., Mosquera, H., Bermúdez, O. M., ... Laissue, P. (2014). Whole-exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology. *PloS One*, *8*(6), e64692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064692>
- Patiño, Liliana C., Beau, I., Morel, A., Delemer, B., Young, J., Binart, N., & Laissue, P. (2019). Functional evidence implicating NOTCH2 missense mutations in primary ovarian insufficiency etiology. *Human Mutation*, *40*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1002/humu.23667>
- Patiño, Liliana C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., ... Harrison, C. A. (2017). BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *102*(3), 1009–1019. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3503>
- Patiño, Liliana Catherine, Battu, R., Ortega-Recalde, O., Nallathambi, J., Anandula, V. R., Renukaradhya, U., & Laissue, P. (2014). Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PloS One*, *9*(10), e109576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109576>

- Patiño, Liliana Catherine, Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., González, R., Suárez, C. F., ... Laissue, P. (2017). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *32*(7), 1512–1520. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex089>
- Patiño, Liliana Catherine, Silgado, D., & Laissue, P. (2017). A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *63*(3), 145–149. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767>
- Plaks, V., Rinkenberger, J., Dai, J., Flannery, M., Sund, M., Kanasaki, K., ... Werb, Z. (2013). Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(27), 11109–11114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309561110>
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, *25*(11–12), 618–635. <https://doi.org/10.1007/s00335-014-9537-8>
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, *13*, 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>
- Quintero-Ronderos, P., & Laissue, P. (2018). The multisystemic functions of FOXD1 in development and disease. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *96*(8), 725–739. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1665-2>
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., González, R., Suárez, C. F., Patarroyo, M. A., ... Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PloS One*, *12*(10), e0186149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186149>
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Gris, J.-C., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Fonseca, D. J., ... Laissue, P. (2017). THBD sequence variants potentially related to recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *15*(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0311-0>
- Rabaglino, M. B., Post Uiterweer, E. D., Jeyabalan, A., Hogge, W. A., & Conrad, K. P. (2015). Bioinformatics approach reveals evidence for impaired endometrial

maturation before and during early pregnancy in women who developed preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 65(2), 421–429. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04481>

- Rajagopalan, S., & Long, E. O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(7), 1093–1100.
- Roten, L. T., Johnson, M. P., Forsmo, S., Fitzpatrick, E., Dyer, T. D., Brennecke, S. P., ... Austgulen, R. (2009). Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 17(2), 250–257. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.158>
- Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., Rice, G. E., & Salomon, C. (2014). Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *Journal of Translational Medicine*, 12, 204. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-204>
- Schmidt, A., Morales-Prieto, D. M., Pastuschek, J., Fröhlich, K., & Markert, U. R. (2015). Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *Journal of Reproductive Immunology*, 108, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.03.001>
- Sitras, V., Paulssen, R. H., Grønaas, H., Leirvik, J., Hanssen, T. A., Vårtun, A., & Acharya, G. (2009). Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta*, 30(5), 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.012>
- Skjaerven, R., Vatten, L. J., Wilcox, A. J., Rønning, T., Irgens, L. M., & Lie, R. T. (2005). Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 331(7521), 877. <https://doi.org/10.1136/bmj.38555.462685.8F>
- Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Murakami, K., & Fukamizu, A. (1996). Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5289), 995–998.
- Than, N. G., Romero, R., Kim, C. J., McGowen, M. R., Papp, Z., & Wildman, D. E. (2012). Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.09.003>

- Trapnell, C., & Salzberg, S. L. (2009). How to map billions of short reads onto genomes. *Nature Biotechnology*, 27(5), 455–457. <https://doi.org/10.1038/nbt0509-455>
- Valero-Rubio, D., Jiménez, K. M., Fonseca, D. J., Payán-Gómez, C., & Laissue, P. (2018). Transcriptomic analysis of FUCA1 knock-down in keratinocytes reveals new insights into the pathogenesis of fucosidosis skin lesions. *Experimental Dermatology*, 27(6), 663–667. <https://doi.org/10.1111/exd.13532>
- van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Konst, A. A. M., Lachmeijer, A. M. A., Dekker, G. A., ... Oudejans, C. B. M. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nature Genetics*, 37(5), 514–519. <https://doi.org/10.1038/ng1541>
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., Laissue, P., Ziyat, A., ... Gris, J.-C. (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *The American Journal of Pathology*, 184(2), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.024>
- Vatin, M., Burgio, G., Renault, G., Laissue, P., Firlej, V., Mondon, F., ... Ziyat, A. (2012). Refined Mapping of a Quantitative Trait Locus on Chromosome 1 Responsible for Mouse Embryonic Death. *PloS One*, 7(8), e43356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043356>
- Williams, P. J., & Broughton Pipkin, F. (2011). The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(4), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.02.007>
- Winn, V. D., Gormley, M., & Fisher, S. J. (2011). The Impact of Preeclampsia on Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface. *Pregnancy Hypertension*, 1(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2010.12.001>
- Zhou, Y., Genbacev, O., & Fisher, S. J. (2003). The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that govern vasculogenesis or leukocyte extravasation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 995, 73–83.
- Zintzaras, E., Kitsios, G., Harrison, G. A., Laivuori, H., Kivinen, K., Kere, J., ... Ioannidis, J. P. A. (2006). Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Human Genetics*, 120(3), 360–370. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0214-1>

10. ANEXOS

ANEXO 1. SUBSET GENES DE PREECLAMPSIA

GEN	NOMBRE
<i>ACE</i>	angiotensin I converting enzyme
<i>ABCC1</i>	ATP binding cassette subfamily C member 1
<i>ABCG2</i>	ATP binding cassette subfamily G member 2
<i>ACVR1A</i>	activin A receptor type 1
<i>ACVR1B</i>	activin A receptor type 1B
<i>ACVR1C</i>	activin A receptor type 1C
<i>ACVR2A</i>	activin A receptor type 2A
<i>ACVR2B</i>	activin A receptor type 2B
<i>ACVRL1</i>	activin A receptor like type 1
<i>ADAM12</i>	ADAM metallopeptidase domain 12
<i>ADD1</i>	adducin 1
<i>ADIPOQ</i>	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
<i>ADIPOR1</i>	adiponectin receptor 1
<i>ADM</i>	adrenomedullin
<i>AFP</i>	alpha fetoprotein
<i>AGT</i>	angiotensinogen
<i>AGTR1</i>	angiotensin II receptor type 1
<i>AGTR2</i>	angiotensin II receptor type 2
<i>ALOX5</i>	arachidonate 5-lipoxygenase
<i>AMBP</i>	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor
<i>ANGPT1</i>	angiopoietin 1
<i>ANGPT2</i>	angiopoietin 2
<i>ANXA5</i>	annexin A5
<i>APC</i>	APC, WNT signaling pathway regulator
<i>APLN</i>	apelin
<i>APLNR</i>	apelin receptor
<i>APOB</i>	apolipoprotein B
<i>APOC3</i>	apolipoprotein C3
<i>APOE</i>	apolipoprotein E
<i>AR</i>	androgen receptor
<i>ARID3A</i>	AT-rich interaction domain 3A
<i>ARNT</i>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

<i>ASCL2</i>	achaete-scute family bHLH transcription factor 2
<i>ATP1B1</i>	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1
<i>ATP2A2</i>	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 2
<i>AVP</i>	arginine vasopressin
<i>BCL6</i>	B-cell CLL/lymphoma 6
<i>BDKRB1</i>	bradykinin receptor B1
<i>BDKRB2</i>	bradykinin receptor B2
<i>BHLHE40</i>	basic helix-loop-helix family member e40
<i>C19orf33</i>	chromosome 19 open reading frame 33
<i>C3</i>	complement C3
<i>CALCRL</i>	calcitonin receptor like receptor
<i>CAPN10</i>	calpain 10
<i>CASP10</i>	caspase 10
<i>CAT</i>	catalase
<i>CAV1</i>	caveolin 1
<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine ligand 2
<i>CCL5</i>	C-C motif chemokine ligand 5
<i>CCR2</i>	C-C motif chemokine receptor 2
<i>CD14</i>	CD14 molecule
<i>CD160</i>	CD160 molecule
<i>CD19</i>	CD19 molecule
<i>CD244</i>	CD244 molecule
<i>CD28</i>	CD28 molecule
<i>CD34</i>	CD34 molecule
<i>CD40LG</i>	CD40 ligand
<i>CD5</i>	CD5 molecule
<i>CD69</i>	CD69 molecule
<i>CDH13</i>	cadherin 13
<i>CDH5</i>	cadherin 5
<i>CDKN1C</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1C
<i>CEACAM5</i>	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5
<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer binding protein alpha
<i>CFD</i>	complement factor D
<i>CFH</i>	complement factor H
<i>CHAD</i>	chondroadherin
<i>CLDN6</i>	claudin 6
<i>CLU</i>	clusterin

<i>CNR1</i>	cannabinoid receptor 1
<i>COL14A1</i>	collagen type XIV alpha 1 chain
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain
<i>COL4A2</i>	collagen type IV alpha 2 chain
<i>COMT</i>	catechol-O-methyltransferase
<i>CORIN</i>	corin, serine peptidase
<i>CP</i>	ceruloplasmin
<i>CPB2</i>	carboxypeptidase B2
<i>CRH</i>	corticotropin releasing hormone
<i>CRHBP</i>	corticotropin releasing hormone binding protein
<i>CRP</i>	C-reactive protein
<i>CSF1</i>	colony stimulating factor 1
<i>CST3</i>	cystatin C
<i>CTLA4</i>	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
<i>CTNNAL1</i>	catenin alpha like 1
<i>CUL4B</i>	cullin 4B
<i>CUL7</i>	cullin 7
<i>CX3CR1</i>	C-X3-C motif chemokine receptor 1
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10
<i>CXCL11</i>	C-X-C motif chemokine ligand 11
<i>CXCL6</i>	C-X-C motif chemokine ligand 6
<i>CXCL8</i>	C-X-C motif chemokine ligand 8
<i>CXCL9</i>	C-X-C motif chemokine ligand 9
<i>CXCR4</i>	C-X-C motif chemokine receptor 4
<i>CXCR5</i>	C-X-C motif chemokine receptor 5
<i>CYBA</i>	cytochrome b-245 alpha chain
<i>CYP11A1</i>	cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1
<i>CYP11B2</i>	cytochrome P450 family 11 subfamily B member 2
<i>CYP17A1</i>	cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1
<i>CYP1A1</i>	cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1
<i>CYP26A1</i>	cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1
<i>DBH</i>	dopamine beta-hydroxylase
<i>DBP</i>	D-box binding PAR bZIP transcription factor
<i>DCN</i>	decorin
<i>DDAH1</i>	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
<i>DIO1</i>	iodothyronine deiodinase
<i>DLX5</i>	distal-less homeobox 5

<i>DLX6</i>	distal-less homeobox 6
<i>DNMT1</i>	DNA methyltransferase 1
<i>DNMT3A</i>	DNA methyltransferase 3 alpha
<i>DNMT3B</i>	DNA methyltransferase 3 beta
<i>DNMT3L</i>	DNA methyltransferase 3 like
<i>DUSP1</i>	dual specificity phosphatase 1
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1
<i>EBAG9</i>	estrogen receptor binding site associated, antigen, 9
<i>EDN1</i>	endothelin 1
<i>EGFL7</i>	EGF like domain multiple 7
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor
<i>ELL2</i>	elongation factor for RNA polymerase II 2
<i>ENG</i>	endoglin
<i>EP300</i>	E1A binding protein p300
<i>EPAS1</i>	endothelial PAS domain protein 1
<i>EPB41L5</i>	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
<i>EPHX1</i>	epoxide hydrolase 1
<i>ERAP1</i>	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
<i>ERAP2</i>	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2
<i>ERVW-1</i>	endogenous retrovirus group W member 1, envelope
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1
<i>F11</i>	coagulation factor XI
<i>F2</i>	coagulation factor II, thrombin
<i>F2R</i>	coagulation factor II thrombin receptor
<i>F5</i>	coagulation factor V
<i>F7</i>	coagulation factor VII
<i>FABP4</i>	fatty acid binding protein 4
<i>FAS</i>	Fas cell surface death receptor
<i>FASLG</i>	Fas ligand
<i>FBN2</i>	fibrillin 2
<i>FCGR3A</i>	Fc fragment of IgG receptor IIIa
<i>FGF1</i>	fibroblast growth factor 1
<i>FIGLA</i>	folliculogenesis specific bHLH transcription factor
<i>FLT1</i>	fms related tyrosine kinase 1
<i>FLT4</i>	fms related tyrosine kinase 4
<i>FN1</i>	fibronectin 1
<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit

<i>FOXA2</i>	forkhead box A2
<i>FOXD1</i>	forkhead box D1
<i>FOXL2</i>	forkhead box L2
<i>FSTL3</i>	follistatin like 3
<i>GABRE</i>	gamma-aminobutyric acid type A receptor epsilon subunit
<i>GADD45G</i>	growth arrest and DNA damage inducible gamma
<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1
<i>GCLM</i>	glutamate-cysteine ligase modifier subunit
<i>GCM1</i>	glial cells missing homolog 1
<i>GFM1</i>	G elongation factor mitochondrial 1
<i>GMNN</i>	geminin, DNA replication inhibitor
<i>GNB3</i>	G protein subunit beta 3
<i>GPX1</i>	glutathione peroxidase 1
<i>GSK3A</i>	glycogen synthase kinase 3 alpha
<i>GSK3B</i>	glycogen synthase kinase 3 beta
<i>GSTP1</i>	glutathione S-transferase pi 1
<i>H19</i>	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
<i>HADHA</i>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
<i>HAT1</i>	histone acetyltransferase 1
<i>HBEGF</i>	heparin binding EGF like growth factor
<i>HDAC9</i>	histone deacetylase 9
<i>HES1</i>	hes family bHLH transcription factor 1
<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor
<i>HIF1A</i>	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit
<i>HLA-DPB1</i>	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
<i>HLA-DQB1</i>	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase 1
<i>HMOX2</i>	heme oxygenase 2
<i>HP</i>	haptoglobin
<i>HPGD</i>	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
<i>HPS3</i>	HPS3, biogenesis of lysosomal organelles complex 2 subunit 1
<i>HSD11B2</i>	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
<i>HSD17B1</i>	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1
<i>HSP90AA1</i>	heat shock protein 90 alpha family class A member 1
<i>HSPA5</i>	heat shock protein family A (Hsp70) member 5
<i>HTR3A</i>	5-hydroxytryptamine receptor 3A

<i>HTRA1</i>	HtrA serine peptidase 1
<i>HTRA3</i>	HtrA serine peptidase 3
<i>ICAM1</i>	intercellular adhesion molecule 1
<i>ICOS</i>	inducible T-cell costimulator
<i>IDO1</i>	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
<i>IFNG</i>	interferon gamma
<i>IGF1</i>	insulin like growth factor 1
<i>IGF1R</i>	insulin like growth factor 1 receptor
<i>IGF2</i>	insulin like growth factor 2
<i>IGF2R</i>	insulin like growth factor 2 receptor
<i>IGFBP1</i>	insulin like growth factor binding protein 1
<i>IGFBP3</i>	insulin like growth factor binding protein 3
<i>IL10</i>	interleukin 10
<i>IL11</i>	interleukin 11
<i>IL13</i>	interleukin 13
<i>IL15</i>	interleukin 15
<i>IL17A</i>	interleukin 17A
<i>IL18</i>	interleukin 18
<i>IL1A</i>	interleukin 1 alpha
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta
<i>IL2</i>	interleukin 2
<i>IL4</i>	interleukin 4
<i>IL4R</i>	interleukin 4 receptor
<i>IL6</i>	interleukin 6
<i>INHHA</i>	inhibin alpha subunit
<i>INHBA</i>	inhibin beta A subunit
<i>INHBB</i>	inhibin beta B subunit
<i>INO80B</i>	INO80 complex subunit B
<i>IRAK4</i>	interleukin 1 receptor associated kinase 4
<i>IRF7</i>	interferon regulatory factor 7
<i>ITGA1</i>	integrin subunit alpha 1
<i>ITGB3</i>	integrin subunit beta 3
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
<i>KDM1A</i>	lysine demethylase 1A
<i>KDR</i>	kinase insert domain receptor
<i>KLK1</i>	kallikrein 1
<i>KLRC1</i>	killer cell lectin like receptor C1

<i>KLRD1</i>	killer cell lectin like receptor D1
<i>KRT19</i>	keratin 19
<i>LCN2</i>	lipocalin 2
<i>LDHA</i>	lactate dehydrogenase A
<i>LDHAP4</i>	lactate dehydrogenase A pseudogene 4
<i>LDHB</i>	lactate dehydrogenase B
<i>LEP</i>	leptin
<i>LEPR</i>	leptin receptor
<i>LGALS1</i>	galectin 1
<i>LGALS13</i>	galectin 13
<i>LIPC</i>	lipase C, hepatic type
<i>LIPE</i>	lipase E, hormone sensitive type
<i>LPAR3</i>	lysophosphatidic acid receptor 3
<i>LPL</i>	lipoprotein lipase
<i>LTF</i>	lactotransferrin
<i>MAN1C1</i>	mannosidase alpha class 1C member 1
<i>MAPK1</i>	mitogen-activated protein kinase 1
<i>MAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase 3
<i>MAS1</i>	MAS1 proto-oncogene, G protein-coupled receptor
<i>MAT1A</i>	methionine adenosyltransferase 1A
<i>MBL2</i>	mannose binding lectin 2
<i>MIR128-1</i>	microRNA 128-1
<i>MIR133B</i>	microRNA 133b
<i>MIR16-1</i>	microRNA 16-1
<i>MIR181A1</i>	microRNA 181a-1
<i>MIR182</i>	microRNA 182
<i>MIR184</i>	microRNA 184
<i>MIR195</i>	microRNA 195
<i>MIR222</i>	microRNA 222
<i>MIR29B2</i>	microRNA 29b-2
<i>MIR302A</i>	microRNA 302a
<i>MIR335</i>	microRNA 335
<i>MIRLET7B</i>	microRNA let-7b
<i>MMP1</i>	matrix metalloproteinase 1
<i>MMP10</i>	matrix metalloproteinase 10
<i>MMP12</i>	matrix metalloproteinase 12
<i>MMP13</i>	matrix metalloproteinase 13

<i>MMP15</i>	matrix metallopeptidase 15
<i>MMP7</i>	matrix metallopeptidase 7
<i>MMP8</i>	matrix metallopeptidase 8
<i>MMP9</i>	matrix metallopeptidase 9
<i>MTHFR</i>	methylenetetrahydrofolate reductase
<i>MTR</i>	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
<i>MTRR</i>	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase
<i>MYD88</i>	myeloid differentiation primary response 88
<i>NADSYN1</i>	NAD synthetase 1
<i>NCAM1</i>	neural cell adhesion molecule 1
<i>NDRG1</i>	N-myc downstream regulated 1
<i>NFKB1</i>	nuclear factor kappa B subunit 1
<i>NOD2</i>	nucleotide binding oligomerization domain containing 2
<i>NOS2</i>	nitric oxide synthase 2
<i>NOS3</i>	nitric oxide synthase 3
<i>NPPA</i>	natriuretic peptide A
<i>NPY</i>	neuropeptide Y
<i>NR1H2</i>	nuclear receptor subfamily 1 group H member 2
<i>NR2F1</i>	nuclear receptor subfamily 2 group F member 1
<i>NR2F2</i>	nuclear receptor subfamily 2 group F member 2
<i>NR3C1</i>	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
<i>NR4A2</i>	nuclear receptor subfamily 4 group A member 2
<i>NRP1</i>	neuropilin 1
<i>NRP2</i>	neuropilin 2
<i>NTRK2</i>	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
<i>OLR1</i>	oxidized low density lipoprotein receptor 1
<i>OSM</i>	oncostatin M
<i>OXGR1</i>	oxoglutarate receptor 1
<i>PAEP</i>	progestagen associated endometrial protein
<i>PAPPA</i>	pappalysin 1
<i>PAPPA2</i>	pappalysin 2
<i>PDGFD</i>	platelet derived growth factor D
<i>PDGFRA</i>	platelet derived growth factor receptor alpha
<i>PDGFRB</i>	platelet derived growth factor receptor beta
<i>PECAM1</i>	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
<i>PGF</i>	placental growth factor
<i>PGR</i>	progesterone receptor

<i>PIK3CB</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta
<i>PLA2G4A</i>	phospholipase A2 group IVA
<i>PLAC1</i>	placenta specific 1
<i>PLAUR</i>	plasminogen activator, urokinase receptor
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia
<i>PON1</i>	paraoxonase 1
<i>PPARD</i>	peroxisome proliferator activated receptor delta
<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator activated receptor gamma
<i>PRDM14</i>	PR/SET domain 14
<i>PSG11</i>	prostaglandin F receptor
<i>PTGFR</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 11
<i>PTGIS</i>	prostaglandin I2 synthase
<i>PTGS1</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
<i>PTH1H</i>	parathyroid hormone like hormone
<i>PTPRC</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type C
<i>PTX3</i>	pentraxin 3
<i>QPCT</i>	glutaminy-peptide cyclotransferase
<i>RARRES2</i>	retinoic acid receptor responder 2
<i>RASSF1</i>	Ras association domain family member 1
<i>REN</i>	renin
<i>RGS2</i>	regulator of G protein signaling 2
<i>ROCK2</i>	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2
<i>RUFY3</i>	RUN and FYVE domain containing 3
<i>RUNX1</i>	runt related transcription factor 1
<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8
<i>SART3</i>	squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3
<i>SCNN1B</i>	sodium channel epithelial 1 beta subunit
<i>SELE</i>	selectin E
<i>SELP</i>	selectin P
<i>SEMA3B</i>	semaphorin 3B
<i>SEMA3C</i>	semaphorin 3C
<i>SERPINA3</i>	serpin family A member 3
<i>SERPINB2</i>	serpin family B member 2
<i>SERPINB5</i>	serpin family B member 5
<i>SERPINE1</i>	serpin family E member 1
<i>SGK1</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1

<i>SIAE</i>	sialic acid acetylase
<i>SIGLEC6</i>	sialic acid binding Ig like lectin 6
<i>SLAMF8</i>	SLAM family member 8
<i>SLC4A1</i>	solute carrier family 4 member 1
<i>SLC9A3</i>	solute carrier family 9 member A3
<i>SLCO4C1</i>	solute carrier organic anion transporter family member 4C1
<i>SMARCA1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1
<i>SMOX</i>	spermine oxidase
<i>SOD1</i>	superoxide dismutase 1
<i>SOD3</i>	superoxide dismutase 3
<i>SPAG4</i>	sperm associated antigen 4
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1
<i>STAT1</i>	signal transducer and activator of transcription 1
<i>STOX1</i>	storkhead box 1
<i>STOX2</i>	storkhead box 2
<i>TAC1</i>	tachykinin precursor 1
<i>TAC3</i>	tachykinin 3
<i>TBX15</i>	T-box 15
<i>TBXA2R</i>	thromboxane A2 receptor
<i>TBXAS1</i>	thromboxane A synthase 1
<i>TEK</i>	TEK receptor tyrosine kinase
<i>TET1</i>	tet methylcytosine dioxygenase 1
<i>TET2</i>	tet methylcytosine dioxygenase 2
<i>TET3</i>	tet methylcytosine dioxygenase 3
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor beta 1
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor beta 2
<i>TGFB3</i>	transforming growth factor beta 3
<i>TH</i>	tyrosine hydroxylase
<i>THBD</i>	thrombomodulin
<i>THBS4</i>	thrombospondin 4
<i>TIMP3</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
<i>TIMP4</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 4
<i>TLR2</i>	toll like receptor 2
<i>TLR3</i>	toll like receptor 3
<i>TLR4</i>	toll like receptor 4
<i>TLR5</i>	toll like receptor 5

<i>TLR6</i>	toll like receptor 6
<i>TLR7</i>	toll like receptor 7
<i>TLR8</i>	toll like receptor 8
<i>TLR9</i>	toll like receptor 9
<i>TNFRSF1A</i>	TNF receptor superfamily member 1A
<i>TNFRSF25</i>	TNF receptor superfamily member 25
<i>TNFSF13B</i>	TNF superfamily member 13b
<i>TP53</i>	tumor protein p53
<i>TRAF6</i>	TNF receptor associated factor 6
<i>TRDMT1</i>	tRNA aspartic acid methyltransferase 1
<i>TREM1</i>	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
<i>TTC4</i>	tetratricopeptide repeat domain 4
<i>TTN</i>	titin
<i>VASH1</i>	vasohibin 1
<i>VCAN</i>	versican
<i>VDR</i>	vitamin D
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A
<i>VEGFC</i>	vascular endothelial growth factor C
<i>VLDLR</i>	very low density lipoprotein receptor
<i>VWF</i>	von Willebrand factor
<i>WFDC1</i>	WAP four-disulfide core domain 1
<i>WWTR1</i>	WW domain containing transcription regulator 1
<i>ZBTB7B</i>	zinc finger and BTB domain containing 7B