



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Departamento de Genética
Facultad de Medicina Universidad de la República

Análisis de metilación de promotores de genes candidatos en parto prematuro severo

Angela Sardina Ferré

Tesina de grado - Licenciatura en Biología Humana

Tutoras: Dra. Silvana Pereyra – Dra. Mónica Cappetta

Laboratorio de Epidemiología Genética

Facultad de Medicina, Universidad de la República

Octubre, 2023

Agradecimientos

Esta tesis se logró gracias a un grupo humano que supo acompañarme a vivir de todo en poco tiempo, una pandemia, una patología, partidas y llegadas de seres especiales pero que de todas formas supimos encontrarnos y desencontrarnos compartiendo la vida.

Hoy le agradezco especialmente a mis tutoras Mónica y Silvana, por la paciencia, por acompañarme en esta etapa en la que viví de todo, y enseñarme compartiendo el conocimiento de lo que hacen.

A Silvana, por compartir su tema de estudio que supo captar mi atención y la de muchos trabajadores de la salud, lo cual nos impulsa a seguir investigando y compartiendo.

A Florencia, Lucia Brignoni, Lucia Bengoechea, Bernardo, Ana María, Lorena y todos los que me he cruzado por este camino divino, que siempre acompañaron el proceso.

A mis padres, a mi hermano Agus, a Majo, a Juli y Gonza; a Bea, Carlos, Ceci, Vicky, Maru, Toti, Gastón, Capu, Lara, Paz y Toto por ser mi familia incondicional.

Gracias a mis amigas que sin ellas no sería tan feliz.

A los Dibiris por ser mi familia elegida.

A Juan por ser mi equipo y darme el regalo más hermoso que podía tener en esta vida, Amalia mi pequeña gran maestra, un ser de luz que llegó a enseñarme de todo y me mostró que tenemos más fuerza de la que pensamos para llegar a las metas soñadas.

A mis guías y seres de luz que están al otro lado por acompañarme siempre.

Muchas gracias a todos y ojalá sigamos encontrándonos para disfrutar y seguir aprendiendo.

Resumen

El parto pretérmino (PPT) es el parto desencadenado antes de 37 semanas de gestación, y es un problema de salud a nivel mundial, siendo la principal causa de muerte y morbilidad infantil. Es una enfermedad compleja, que puede desencadenarse por factores genéticos, sociales y/o ambientales. En Uruguay anualmente 12% de los niños nacen prematuros, siendo un problema de salud nacional causando problemas en el desarrollo a corto y largo plazo.

Previamente en el laboratorio se identificó un conjunto de genes diferencialmente expresados en recién nacidos PPT severos en la población uruguaya. Nuestro objetivo es evaluar si estos genes tienen cambios en la metilación del ADN de sus promotores que expliquen el cambio en su expresión. Para estudiarlo seleccionamos 6 genes diferencialmente expresados entre aquellos con mayores tasas de cambio logarítmico absolutas: *GK*, *CES4A*, *MIR155HG*, *NIBAN1*, *PIK3AP1* y *LAMP3*. Se amplificaron por PCR y se secuenciaron ADNs tratados con bisulfito de sodio de 4 pacientes con PPT severo y 6 con parto a término como controles. Se secuenciaron mediante la plataforma MinION (Nanopore) y se diseñó un *pipeline* de análisis bioinformático para estimar el porcentaje de metilación de cada CpG en las regiones estudiadas.

Detectamos una hipometilación del promotor de *MIR155HG* en recién nacidos PPT severos en comparación a los controles, en concordancia con la sobreexpresión en prematuros reportada previamente. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas estadísticamente según el test de Wilcoxon. Estos resultados preliminares deben ser analizados en un muestreo mayor, para validar el efecto de la metilación de ADN en estos promotores génicos sobre el PPT.

Palabras claves: parto prematuro, metilación del ADN, promotores, Nanopore

Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Índice	3
Introducción.....	4
a. Parto prematuro: definición	4
b. Causas del parto prematuro	5
c. Antecedentes de estudios del parto pretérmino en la población uruguaya	5
d. Epigenética y metilación del ADN en parto pretérmino.....	6
e. Hipótesis de trabajo.....	9
Objetivos	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos	10
Metodología	11
a. Estrategia de trabajo	11
b. Población de estudio.....	11
c. Selección de promotores candidatos.....	12
d. Diseño de oligonucleótidos.....	13
e. Puesta a punto y amplificación de promotores génicos	14
f. Secuenciación Sanger de los productos de PCR	16
g. Secuenciado de promotores génicos	16
Resultados	18
a. Optimización de amplificación de promotores génicos.	18
b. Secuenciación de promotores génicos con MinION	19
c. Análisis de metilación diferencial en promotores	22
Discusión:.....	25
Conclusiones.....	30
Bibliografía	31
Material suplementario	37

Introducción

a. Parto prematuro: definición

El parto prematuro (PPT) es el parto desencadenado antes de las 37 semanas de gestación. Es una patología compleja, que causa problemas de salud en los recién nacidos a corto y a largo plazo, como problemas de crecimiento, riesgo de alteraciones en el neurodesarrollo y en las vías respiratorias, problemas oftalmológicos, y otros. Tiene una incidencia de más de 10% a nivel mundial (Goldenberg *et al.*, 2008) y es una de las principales causas de mortalidad en menores de 5 años a nivel mundial (Liu *et al.*, 2012). Particularmente, en Uruguay entre los años 2014 y 2021 la incidencia del parto prematuro fue de entre 10,2% y 13,5% en el Centro Hospitalario Pereira Rosell (CHPR) (Figura 1) (CHPR, 2018, 2019, 2020, 2021). Llamativamente, en 2020, durante la pandemia de SarsCov2, la incidencia de PPT aumentó a 13,5% en Uruguay a diferencia de otros países de la región (Briozzo *et al.*, 2021).

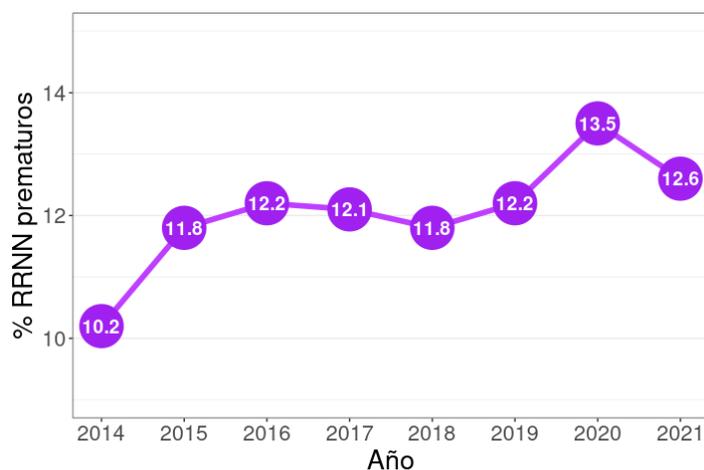


Figura 1. Porcentaje de recién nacidos prematuros nacidos en CHPR entre 2014 y 2021 (Datos obtenidos del Dpto. de Registros médicos CHPR, sector Estadística/Sistema informático Perinatal.)

El PPT puede ser clasificado según su causa obstétrica en: 1) espontáneo con membranas intactas, 2) espontáneo con ruptura prematura de membranas, y 3) el indicado por causas médicas, tanto maternas como fetales (Goldenberg *et al.*, 2008; Parets *et al.*, 2014). El PPT espontáneo representa el 60-70% de todos los nacimientos pretérminos (Goldenberg *et al.*, 2008).

El PPT también se clasifica de acuerdo con la edad gestacional (EG) en la que se desencadenan: los neonatos nacidos entre las 24 a 33 semanas + 6 días de EG son considerados prematuros severos, mientras que los restantes (34 a 36s+6d) son considerados moderados a leves (WHO, 2023). La mayor incidencia de complicaciones neonatales y casi la mitad de las muertes perinatales se producen en los PPT severos, dando cuenta de la mayor parte de la morbilidad perinatal (Saigal & Doyle, 2008).

b. Causas del parto prematuro

El parto pretérmino es considerado un síndrome, por ser atribuible a múltiples procesos patológicos, y también una enfermedad multifactorial, ya que es afectado por causas ambientales, sociales y genéticas (Goldenberg *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2014). Si bien hay características que se reconocen típicas del PPT con respecto a su fisiología, no hay certeza de qué es lo que lo desencadena (Briozzo *et al.*, 2021).

Se propone que el parto prematuro se desencadena por procesos patológicos asociados a procesos inflamatorios. Éstos últimos pueden estar relacionados a patógenos, infecciones y factores de riesgo ambientales como la exposición al humo de tabaco y uso de drogas (Gomez-Lopez *et al.*, 2022; Rey *et al.*, 2012; Strauss *et al.*, 2018).

Hay evidencia de que los factores genéticos inciden en el desencadenamiento del parto pretérmino. El parto prematuro tiene una genética compleja: esta influenciado por la interacción de dos genomas, el fetal y el materno, la interacción propia entre genes y también la interacción con el ambiente (York *et al.*, 2013). A su vez, se sabe que los componentes genéticos son relevantes en el desencadenamiento del PPT espontáneo (Goldenberg *et al.*, 2008, York *et al.*, 2013). El PPT presenta agregación familiar: mujeres que nacieron de partos pretérmino son propensas a tener partos prematuros, además de la probabilidad de tener otro parto prematuro si ya tuvieron uno, siendo este último dato uno de los mayores predictores de parto pretérmino actualmente (Crider *et al.*, 2005). Por otro lado, el PPT tiene heredabilidad estimada de entre 25 y 40 % en estudios de gemelos mono y dicigóticos (Clausson *et al.*, 2000).

Por otro lado, en varios estudios se encontró una relación entre ancestría y parto pretérmino. En particular, las mujeres afroamericanas tienen un riesgo casi dos veces mayor de tener un parto prematuro al de mujeres de ascendencia europea con características demográficas similares (Goldenberg *et al.*, 2002). Tener al menos un padre con ancestría afroamericana aumenta el riesgo de tener parto prematuro (Green *et al.*, 2021).

c. Antecedentes de estudios del parto pretérmino en la población uruguaya

A pesar de los esfuerzos de investigación en prematurez, no se han encontrado genes asociados a PPT que sean reproducibles en las diferentes poblaciones. Causa de esto es que es una enfermedad genética compleja, donde varios genes pueden estar causando la patología (Romero *et al.*, 2014). Por otro lado, gran parte de los estudios se basan en

poblaciones de origen europeo y no necesariamente los resultados encontrados en ellas son reproducibles y/o aplicables a poblaciones menos representadas y/o mestizadas (Fatumo *et al.*, 2022; Sirugo *et al.*, 2019). La población uruguaya es una población mestizada tri-híbrida, con una contribución genética europea, de nativo americanos y africanos (Hidalgo *et al.*, 2005; Sans *et al.*, 1997, 2021), por lo que los resultados encontrados en otras poblaciones no necesariamente se le apliquen.

El PPT es una enfermedad compleja que ha sido estudiada desde varios abordajes, como estudios de asociación del genoma completo, secuenciación del exoma completo, transcriptómica y combinaciones. Sin embargo, muchos de estos estudios fueron de tamaño pequeño o se centraron en una sola población o región geográfica con datos limitados, particularmente en poblaciones con alto riesgo de PPT (Jain *et al.*, 2022).

Actualmente, no se conocen marcadores propios de la población uruguaya asociados con el parto prematuro, a pesar de haberse encontrado algunas asociaciones leves y epistáticas (Pereyra, 2019; Rey *et al.*, 2008). En estudios previos de nuestro laboratorio se estudiaron transcriptomas de muestras de membranas corioamnióticas de prematuros severos y de recién nacidos a término. En este estudio se encontraron 270 genes diferencialmente expresados en prematuros severos en comparación con partos a término, que establecen un patrón característico de prematurez severa (Pereyra *et al.*, 2019). La mayoría de los genes diferencialmente expresados encontrados están vinculados a vías de inflamación e inmunidad. Estas vías están sobre expresadas en prematurez severa (Pereyra *et al.*, 2019), en concordancia con la hipótesis del parto pretérmino como un evento inflamatorio (Romero *et al.*, 2014).

d. Epigenética y metilación del ADN en parto pretérmino

La metilación del ADN es esencial para el desarrollo de todos los mamíferos, y entre ellos los humanos. Tiene funciones relevantes en el silenciamiento de genes y la estabilidad genómica, incluso tan temprano como en células embrionarias en etapas iniciales del desarrollo (Smith & Meissner, 2013). La expresión génica puede ser modulada por diferentes mecanismos epigenéticos que pueden influenciar la actividad génica tanto transcripcionalmente como post transcripcionalmente. Estos diferentes mecanismos epigenéticos intervienen en la diferenciación celular, adaptabilidad celular, variabilidad y morfogénesis. Estos mecanismos pueden influir en la expresión génica dando como resultado consecuencias moleculares y funcionales. Los mecanismos epigenéticos que involucran modificaciones del ADN y de histonas, pueden ocasionar silenciamiento de genes sin cambiar la secuencia del ADN, como ocurre con la metilación del ADN (Šerman *et al.*,

2006; Stephens *et al.*, 2013). Además, estas alteraciones pueden mantenerse en las diferentes divisiones celulares e incluso transmitirse a una línea celular específica y pasar de generación en generación (Moosavi & Ardekani, 2016; Stephens *et al.*, 2013). El estudio de enfermedades humanas se ha enfocado en mecanismos genéticos, pero hoy en día se sabe que los mecanismos epigenéticos en sí mismos pueden ocasionar patologías, como ha sido ampliamente estudiado en cáncer. Así, el desarrollo de estudios epigenéticos puede revelar mecanismos patológicos hasta ahora no encontrados (Egger *et al.*, 2004).

La metilación del ADN participa del silenciamiento de los genes, mediante la metilación de los promotores génicos que los regulan (Ambrosi *et al.*, 2017). Las citosinas del ADN seguidas de guaninas forman los llamados sitios CpGs. A las regiones ricas en sitios CpGs se les denomina islas CpGs y es común encontrarlas en la región promotora de los genes, o cercanas a los sitios de inicio de la transcripción. Estas islas contienen un porcentaje de bases citosina y guanina (C+G) mayor al 50 % y hay más de 28 mil islas en todo el genoma humano (Babenko *et al.*, 2017).

Las metiltransferasas de ADN son las enzimas encargadas de agregar los grupos metilo en la posición cinco de la pirimidina de las citosinas que están formando estos dinucleótidos CpG. Esta modificación es reversible. Los patrones de metilación incluso pueden ser hereditarios y se sabe que los CpGs del ADN humano están metilados entre el 70 y 80% (Andersen & Tost, 2018; Moosavi & Ardekani, 2016).

Se ha encontrado que la metilación del ADN puede aumentar el riesgo de padecer un parto pretérmino (Menon *et al.*, 2012). Varios trabajos evidencian el papel de la metilación del ADN en prematuridad en diferentes tejidos. El tejido placentario, las membranas fetales y la sangre del cordón umbilical son ejemplos de tejidos relevantes en el estudio del PPT y que se pueden obtener a través de métodos no invasivos (Menon *et al.*, 2012).

En el estudio de Vidal *et al.* (2014) se midió metilación del ADN en regiones diferencialmente expresadas en sangre periférica y del cordón umbilical en diadas de madre-hijo usando pirosecuenciación previo tratamiento con bisulfito de sodio. Se evaluó la asociación entre PPT y el estrés, concluyendo que el estrés materno puede estar ocasionado por cambios epigenéticos. Por otro lado, en otro estudio que analizó muestras de sangre de cordón umbilical se estudió el genoma de leucocitos fetales, observándose una gran diferencia entre la metilación del ADN fetal entre los recién nacidos prematuros y los recién nacidos a término (Parets *et al.*, 2013).

Wang *et al.* (2020) identificaron 8 regiones diferencialmente metiladas en ADN placentario que se asociaron significativamente con el PPT. Los sitios CpG diferencialmente metilados en PPT se asociaron a genes que participan en procesos biológicos principalmente

relacionados con el neurodesarrollo, la regulación de la inflamación y el metabolismo. Por otro lado, Mitsuya *et al.* (2014) estudiaron tejido uterino, más específicamente el miometrio (en distintas situaciones como cesáreas a término con o sin trabajo de parto, prematuros sin trabajo de parto, trabajo de parto prematuro idiopático y gestaciones gemelares con trabajo de parto) encontrando que la mayor parte de la metilación diferencial del ADN de los genes asociados a la contracción del miometrio se produce fuera de las islas CpG en los promotores de genes.

Kim *et al.* (2013) establecieron un perfil de metilación del ADN de todo el genoma del amnios humano a partir de partos a término (con y sin trabajo de parto) y prematuros. Encontraron conjuntos de genes diferencialmente metilados, evidenciando de manera preliminar que los cambios de metilación del ADN en el amnios pueden estar involucrados en la fisiología del trabajo de parto y la etiología del PPT.

Los factores de riesgo maternos que pueden producir cambios en la metilación del ADN e incrementar el riesgo de padecer un parto pretérmino son múltiples (Figura 2), estos pueden ser: estrés materno, nutrición, desencadenantes de procesos inflamatorios, tabaquismo y nivel socioeconómico, entre otros. Los cambios epigenéticos, sumados a la predisposición genética y el ambiente, pueden ser desencadenantes de enfermedades (Parets *et al.*, 2014).

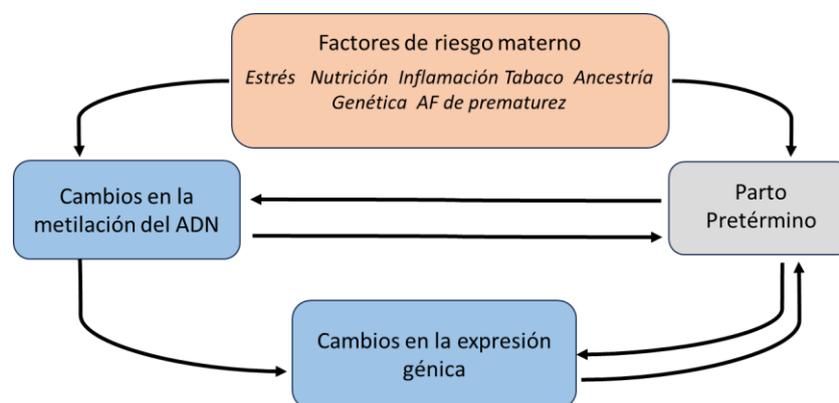


Figura 2. Relación entre factores de riesgo materno, metilación del ADN y cambios en la expresión génica con el parto pretérmino.

Si bien acerca de la epigenética del PPT hay mucha información, todos estos trabajos se han realizado en diferentes poblaciones. El contexto genético y medioambiental de las poblaciones estudiadas es potencialmente diferente a la población uruguaya, en la cual no hay antecedentes de estudios epigenéticos vinculados con PPT. A su vez, no hay descritos

hasta el momento estudios de alteraciones en la metilación del ADN en membranas corioamnióticas de pacientes pretérminos severos.

e. Hipótesis de trabajo

En este contexto, en este trabajo buscamos analizar el patrón de metilación de un grupo de promotores de genes candidatos diferencialmente expresados en prematuridad severa (menos de 34 semanas de EG), según Pereyra *et al.* (2019). Nuestra hipótesis de trabajo es que las diferencias de expresión génica en membranas corioamnióticas podrían estar dadas por diferencias en la metilación del ADN en los promotores génicos. Esperamos entonces encontrar una hipermetilación del ADN en aquellos promotores génicos con subexpresión y/o hipometilación en los sobreexpresados en prematuridad severa. De esta manera, buscamos ampliar el conocimiento sobre esta patología, contribuir a predecir el riesgo del parto prematuro y colaborar con la prevención de este problema en la salud de la población uruguaya.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el estado de metilación de promotores de genes candidatos diferencialmente expresados en recién nacidos prematuros severos en la población uruguaya.

Objetivos específicos

Diseñar oligonucleótidos para amplificar promotores de genes candidatos de parto prematuro.

Poner a punto la amplificación de los promotores de los genes seleccionados a partir de ADN tratado con bisulfito de sodio.

Evaluar si hay metilación diferencial en las muestras de recién nacidos a término y recién nacidos a pretérmino severo.

Metodología

a. Estrategia de trabajo

Para cumplir los objetivos nos planteamos una estrategia de trabajo que consistió en primer lugar en elegir genes candidatos vinculados a parto pretérmino, los seleccionados son: *GK*, *CES4A*, *MIR155HG*, *NIBAN1*, *PIK3AP1* y *LAMP3* (Tabla 1). Diseñamos oligonucleótidos en los promotores de cada gen seleccionado, para amplificar cada región de interés a partir de ADN tratado con bisulfito de sodio.

A continuación, realizamos un análisis de metilación, mediante secuenciación con la plataforma MinION (Oxford Nanopore, UK). Para esto, amplificamos los promotores génicos a partir de ADN tratado con bisulfito de sodio de membranas corioamnióticas, comparando recién nacidos de partos pretérmino severos y partos a término. Mediante análisis bioinformático estudiamos el estado de metilación de los sitios CpGs en cada promotor génico.

En la Figura 3 presentamos el orden de los pasos que seguimos para analizar la metilación de las muestras elegidas.

b. Población de estudio

Diseñamos un estudio de tipo caso-control. Este estudio compara casos de recién nacidos prematuros espontáneos nacidos previo a la semana 34 de gestación (pretérminos severos) y controles de recién nacidos a término (luego de 37 semanas de gestación). Las muestras biológicas provienen de tejido corioamniótico de mujeres que recibieron atención obstétrica entre el 2013 y el 2015 en el Centro Hospitalario Pereira Rossell (Pereyra *et al.*, 2019). Dichas muestras fueron seleccionadas con los siguientes criterios de exclusión: embarazos múltiples, consumo de drogas, patologías crónicas, malformaciones fetales, y pacientes portadoras de VIH. Se seleccionaron 6 muestras de membranas de recién nacidos a término y 4 de recién nacidos a pretérmino severo.

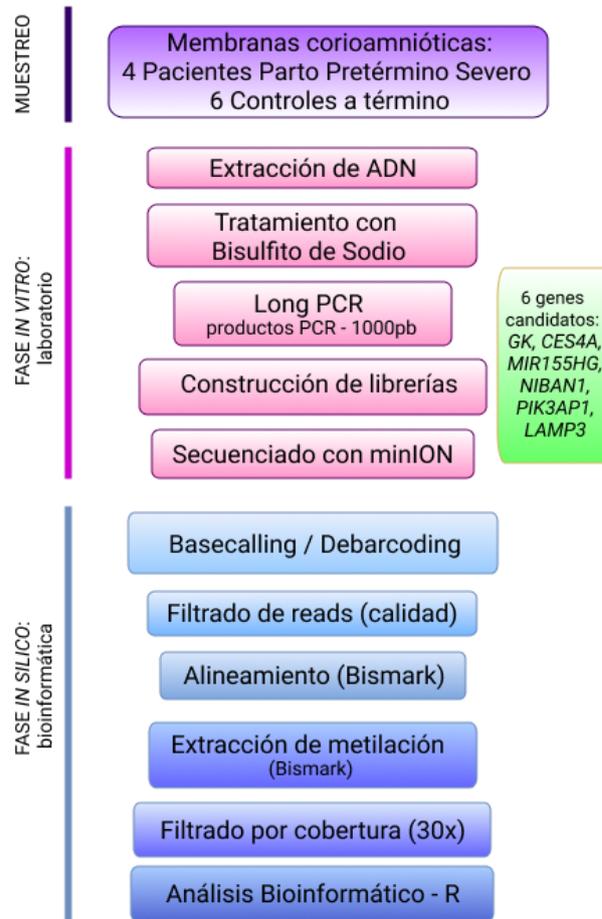


Figura 3. Metodología de trabajo empleada.

c. Selección de promotores candidatos

Para este trabajo inicialmente seleccionamos 6 genes diferencialmente expresados identificados como asociados a parto pretérmino severo, seleccionados entre aquellos con mayores tasas de cambio logarítmico absolutas (Pereyra *et al.*, 2019). Los genes seleccionados a estudiar fueron *GK, CES4A, MIR155HG, NIBAN1, PIK3AP1, LAMP3*, tal como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes seleccionados entre los diferencialmente expresados entre parto a término y a pretérmino severo (Pereyra et al., 2019).

ID del gen Ensembl	Gen	Ubicación	Tasa de cambio logarítmica absoluta	p valor	P valor ajustado
ENSG00000198814	GK	chrX:30671476-30748725	5,042037261	3,09E-07	0,000111456
ENSG00000172824	CES4A	chr16:67022492-67043661	-2,687493315	8,46E-07	0,000191967
ENSG00000234883	MIR155HG	chr21:26934221-26947480	2,658001799	6,55E-07	0,000162523
ENSG00000135842	NIBAN1	chr1:184759858-184943682	4,263754111	7,12E-06	0,000778744
ENSG00000155629	PIK3AP1	chr10:98353069-98480271	4,368954446	7,28E-06	0,000782082
ENSG00000078081	LAMP3	chr3:182840001-182881627	3,395373211	7,95E-06	0,00083504

d. Diseño de oligonucleótidos

Diseñamos los oligonucleótidos que van a actuar como cebadores para amplificar los genes candidatos a partir de ADN tratado con bisulfito de sodio. Utilizamos la plataforma Genome Browser UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) para obtener la secuencia de ADN de los promotores génicos seleccionados. En dichas secuencias se identificaron islas CpGs, SNPs y regiones repetidas.

Luego de la selección de la región promotora de nuestro interés, diseñamos los oligonucleótidos con el software Methyl Primer Express v1.0 (*Methyl Primer Express™ Software v1.0*). Para ello se establecieron los siguientes criterios: 1) que contengan al menos 2 citosinas fuera del contexto CpG, 2) que no contengan CpGs, 3) que no contengan SNPs, 4) que el amplicón no incluya secuencias repetidas, y 5) que en lo posible el extremo 3' del oligonucleótido sea una guanina o citosina. Se diseñan los oligonucleótidos con el fin de poder amplificar alrededor de mil pares de bases. Para los demás parámetros, usamos los establecidos por defecto en el programa.

Para tener mayor especificidad y rendimiento realizamos una PCR anidada, que ocurre en dos etapas. Para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos más externos para la primera ronda de amplificación (1F y 1R) y uno más interno para la segunda (2F y 2R). Para el gen GK, excepcionalmente se diseñaron los oligonucleótidos dentro de la isla debido al gran tamaño de esta.

Para corroborar que los oligonucleótidos son específicos de la región a amplificar, usamos la plataforma online Bisearch Web Server (Tusnádý et al., 2005), donde se emuló una PCR virtual sobre ADN tratado con bisulfito de sodio con los oligonucleótidos diseñados. De esta forma corroboramos que cada oligonucleótido únicamente amplifica la región de interés y

que el tamaño de nuestro producto de PCR es el esperado. La Tabla 2 presenta los oligonucleótidos diseñados. Los oligonucleótidos de la segunda ronda de amplificación tienen un agregado de una secuencia de nucleótidos, necesarias para el posterior paso de secuenciación en la plataforma minION (Oxford Nanopore, UK). En los oligonucleótidos directos de la segunda ronda se le agrega la secuencia 5' TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC-3'; y en los reversos la siguiente: 5' ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC-3', ambas en el extremo 5'.

e. Puesta a punto y amplificación de promotores génicos

Cada par de cebadores elegidos para cada uno de los genes fue probado con distintas temperaturas en base a su Temperatura media (T_m) teórica, para encontrar su temperatura óptima de amplificación. Las temperaturas a las cuales los genes amplificaron con buena eficiencia se presentan en la Tabla 3.

Todas las muestras de ADN analizadas fueron tratadas con bisulfito de sodio previamente a su amplificación. Para ello utilizamos el kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research). El ADN tratado con bisulfito de sodio nos permite observar el estado de metilación en CpGs, permitiendo diferenciar ADN metilado del ADN no metilado, ya que el bisulfito de sodio cambia las citosinas no metiladas por uracilos. Las muestras de ADN tratado fueron cuantificadas mediante Qubit con el kit Qubit ssDNA assay (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor.

Realizamos las reacciones de amplificación en los termocicladores Gene Amplification PCR System 9700 o Veriti (Applied Biosystems) utilizando 1 μ l de ADN tratado con bisulfito de sodio como molde, 0,9 μ L de buffer PCR 11X, 7,62 μ L de H₂O miliQ, 0,12 μ L de Tris base 1M, 0,06 μ L de mezcla de Taq polimerasa (Bioline) compuesto por High Taq pol (5 u/ μ L) y Velocity (2U/ μ L) en relación 20:1, 0,3 μ L de solución de cebadores directo y reverso 10 μ M cada uno. Las reacciones de la primera ronda se realizaron en un volumen final de 10 μ l. Para la primera ronda de PCR se utilizó el siguiente programa de ciclado: 1 ciclo de 5 minutos a 96 °C, 35 ciclos de 20 segundos a 96 °C, 30 segundos a la temperatura de *annealing óptima*, y una extensión final de 2 minutos a 72°C según Tabla 3. Los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización. Para la segunda ronda utilizamos 0,5 μ l de producto de PCR de la primera ronda como molde, 1,8 μ L de buffer PCR 11X, 16,53 μ L de H₂O miliQ, 0,25 μ L de Tris base 1M, 0,12 μ L de mezcla de Taq polimerasa, 0,8 μ L de solución de cebadores directo y reverso (10 μ M cada uno) para segunda ronda. Las reacciones de la segunda ronda se realizaron en un volumen final de 20 μ l. Para la segunda ronda de PCR se utilizó el siguiente programa de ciclado: 1 ciclo de 5 minutos a 96 °C, 32

ciclos de 20 segundos a 96 °C, 30 segundos a la temperatura de *annealing* óptima, y una extensión final de 1:30 minutos a 72°C según Tabla 3.

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con buffer de corrida TBE 0,5x, incluyendo en cada corrida 0,5µl de marcador de peso molecular 100pb (Bioron, Germany). Visualizamos los amplicones utilizando una tinción con SYBERSafe (Invitrogen).

Tabla 2. Listado de secuencias de los oligonucleótidos diseñados de primera y segunda ronda para cada uno de los genes.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Largo del amplicón (pb)
NIBAN1_1F	TTGAGGGTTTTTTTAAATGAG	1051
NIBAN1_2F	<i>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGAGGGAAATTTTGTTTAG</i>	
NIBAN1_R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCACTTCTCCAAAATATTC	830
CES4A_1F	AGGTGTTTAGGGTAGGTAG	1008
CES4A_1R	TAATCCAACAACCCCAATT	
CES4A_2F	<i>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTTGTTGGATTTTGTTTGGG</i>	677
CES4A_2R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCAACCTTACCCCTCTAAAAC	
GK_1F	GTAAATTTAAGGTTAAGGGAG	995
GK_1R	CCATAAAACCAACTTCAAATC	
GK_2F	<i>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCATTTTATATGGGGTTAATTTAG</i>	500
GK_2R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTACCCCAAAACTCCAAAAC	
LAMP3_1F	GGGGAGAATTGTTTAGGTAAG	860
LAMP3_R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCACAATAAATTTCTCTAACACC	
LAMP3_2F	<i>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTTTAATGTTTAGGGGAAAAGTT</i>	657
MIR155HG_1R	TACCCCTCTAATATATTTTAC	807
MIR155HG_F	<i>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTTAAGAATAGGTAGGAGGGGG</i>	777
MIR155HG_2R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTAACCCTCAACAAAAAACTA	
PIK3AP_1F	TATTTTTAGGGTTAGAGGTGG	815
PIK3AP_1R	CAAAAACCTAAAAACAAAACCC	
PIK3AP_2F	<i>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCGTTAGGTAGGGGTTGAAG</i>	670
PIK3AP_2R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTCCAAAACCTAACAACC	

Tabla 3. Temperaturas óptimas de annealing de oligonucleótidos para amplificación en primera y segunda ronda, para los genes *PIK3AP1*, *MIR155HG* y *GK*.

Gen	Ronda	Temperatura (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
<i>PIK3AP1</i>	R1	54	815
	R2	54	670
<i>MIR155HG</i>	R1	53	807
	R2	56	777
<i>GK</i>	R1	55	995
	R2	54	500

f. Secuenciación Sanger de los productos de PCR

Para verificar los resultados obtenidos de la amplificación, los productos de PCR de la segunda ronda fueron analizados por secuenciación Sanger (Macrogen, Corea) para verificar su identidad. Luego de obtenidas las secuencias de los tres genes de interés *GK*, *PIK3AP1*, *MIR155HG*, las verificamos comparando la secuencia obtenida con una secuencia de referencia tratada con bisulfito de sodio obtenida previamente a partir del programa Methyl Primer Express v1.0. Realizamos la comparación con un alineamiento en la plataforma online Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

g. Secuenciado de promotores génicos

Para el análisis de metilación realizamos la secuenciación de los promotores génicos de *GK*, *MIR155HG*, y *PIK3AP1* para 6 muestras de pretérmino severo y 4 controles nacidos a término, mediante la plataforma minION (Oxford Nanopore, UK). Para ello realizamos un *pool* con los amplicones de cada paciente y los mismos se utilizaron para preparar las librerías con el kit PCR Barcoding SQK PBK004 (Oxford Nanopore, UK) lo que nos permitió marcar cada individuo con un *barcode*. La técnica se realizó siguiendo el protocolo del proveedor.

Las secuencias obtenidas fueron filtradas por calidad usando Nanofilt (De Coster *et al.*, 2018), reteniendo aquellas lecturas con una calidad igual o mayor de 7. Las lecturas filtradas fueron alineadas al genoma de referencia humano (GRCh38) con el programa Bismark, programa que detecta con precisión el estado de metilación (Krueger *et al.*, 2012; Krueger & Andrews, 2011), ajustando los parámetros para lecturas largas (Pereyra *et al.*, 2021). El

mismo programa fue utilizado para extraer el porcentaje de metilación de cada CpG, que se calculó según la fórmula: $\%5mC/(5mC+C)$.

Los siguientes análisis de los datos de conteo de citosinas metiladas y no metiladas obtenidas con Bismark fueron realizados utilizando el programa R (R Core Team, 2021). Estos resultados de conteo de citosinas fueron filtrados por región genómica de interés y por cobertura, reteniendo aquellos CpG con 30 o más *lecturas*. Para ello usamos los paquetes readr (Wickham & Hester, 2020), dplyr (Müller, 2021), GenomicRanges (Carey, 2013), y reshape2 (Wickham, 2007). Para graficar el porcentaje de metilación de cada gen en función de la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción (TSS) usamos el paquete ggplot2 (Wickham, 2016).

Comparamos los niveles de metilación entre ambos grupos utilizando el test estadístico de Wilcoxon.

Resultados

a. Optimización de amplificación de promotores génicos.

Logramos amplificar tres promotores génicos con buena calidad: *PIK3AP1*, *MIR155HG* y *GK*, con las temperaturas de *annealing* óptimas reportadas en la Tabla 3.

En la Figura 4 se observa la región promotora de cada gen de interés, donde en verde se marcan las islas CpG, y en rojo la región amplificada.

Para los genes restantes (*CES4A*, *NIBAN1* y *LAMP3*) no obtuvimos buenas eficiencias de amplificación, por lo que se eliminaron del estudio.

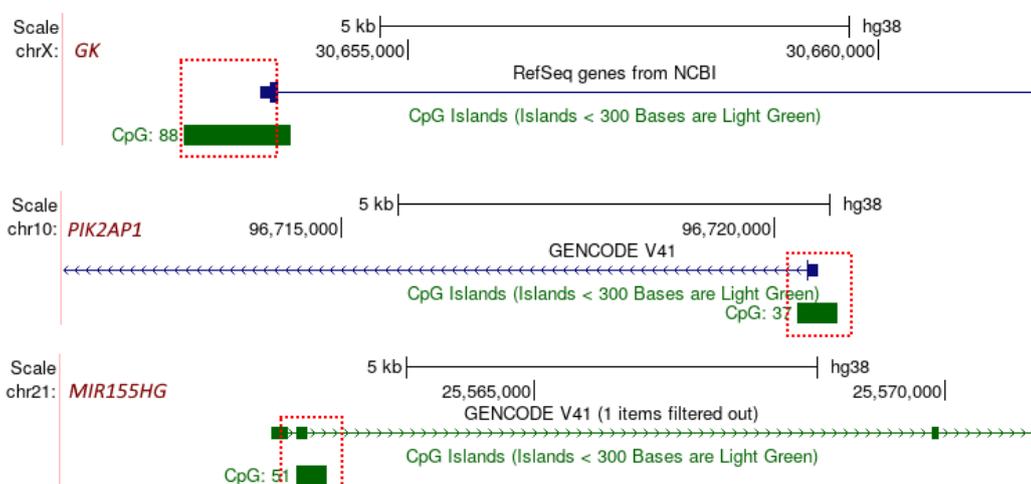


Figura 4. Ubicación de la región amplificada de los genes *GK*, *PIK3AP1* y *MIR155HG*, donde se muestra la isla CpG más próxima y en el recuadro rojo punteado la región promotora amplificada. Las imágenes fueron tomadas del Genome Browser y luego modificadas con un editor de imagen para la señalización de la región promotora de interés.

En la Figura 5 se visualiza la electroforesis en gel de agarosa 1% con los productos de PCR de cada gen de interés, detectándose los amplicones de los tamaños esperados. En los tres casos comparamos con un marcador de peso molecular de 100pb.

Se secuenciaron por método Sanger los productos amplificados de los genes *GK*, *PIK3AP1* y *MIR155HG*, y se alinearon a una secuencia de referencia tratada *in silico* con bisulfito de sodio. El alineamiento tuvo una buena identidad, por lo que nos permiten confirmar que los oligonucleótidos amplifican la secuencia esperada (Figuras S1 y S2, ver material suplementario).

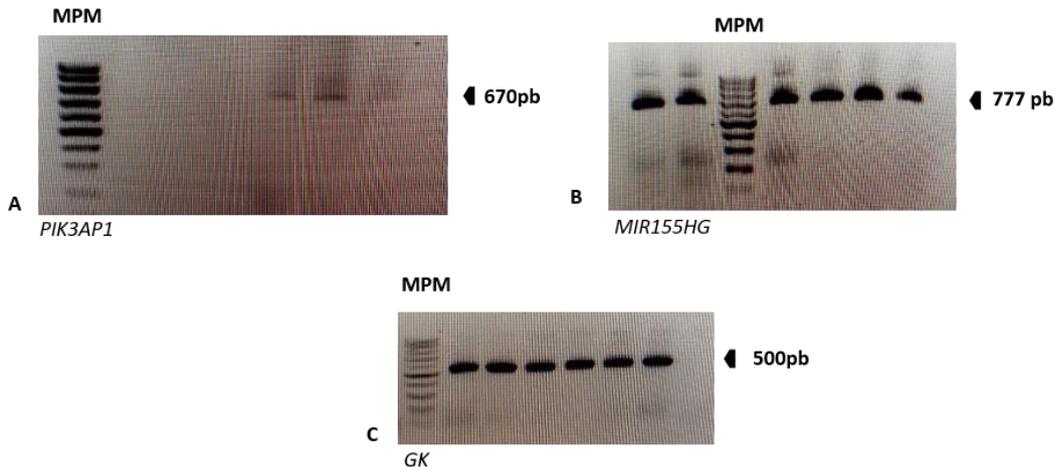


Figura 5. Electroforesis de geles de agarosa de la amplificación de los promotores correspondientes a A, *PIK3AP1*; B, *MIR155HG*; C, *GK*. MPM es el marcador de peso molecular de 100pb.

b. Secuenciación de promotores génicos con MinION

La secuenciación de los promotores seleccionados se realizó en una celda de MinION junto a otras regiones genómicas no incluidas en esta tesis. Luego del filtrado por calidad de la secuenciación total, se obtuvieron 229919 lecturas, las cuales fueron alineadas al genoma de referencia con un porcentaje de alineamiento entre 77 % y 87%, dependiendo de la muestra.

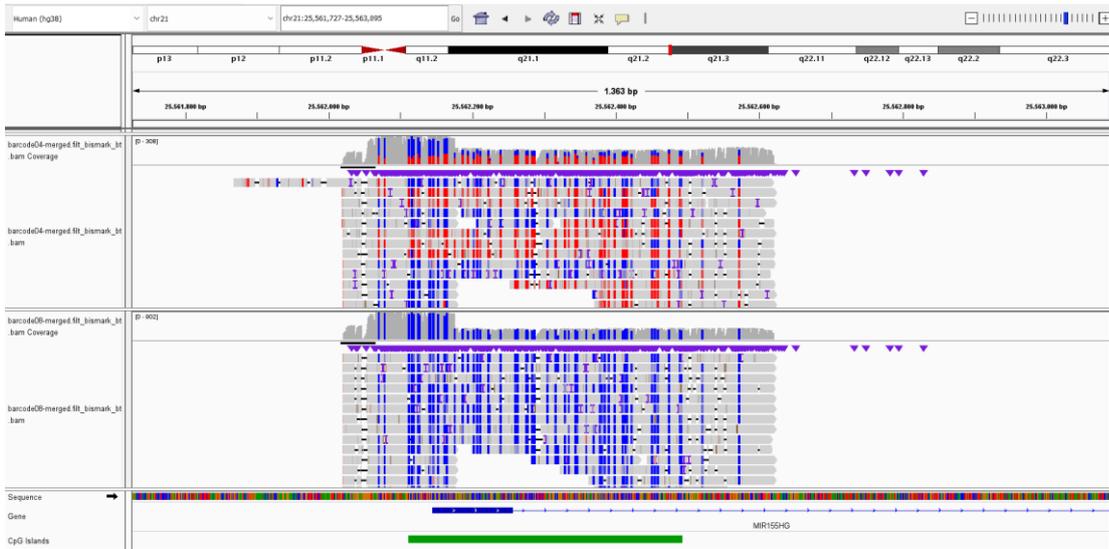
Las secuencias alineadas de cada muestra fueron visualizadas en el programa IGV (Robinson *et al.*, 2011). En las Figuras 6-8, comparamos dos muestras para la secuenciación de *MIR155HG*, *GK* y *PIK3AP1* respectivamente, donde observamos diferencia en los niveles de metilación. Esta diferencia se denota por diferencias en la cantidad de citosinas y timinas en ambas muestras, producto del tratamiento con bisulfito de sodio. En la Figura 6.B podemos visualizar una región del gen *MIR155HG* en aumento donde apreciamos la diferencia de metilación a partir de un patrón de citosinas (metiladas, en rojo) y timinas (correspondientes a citosinas desmetiladas, en azul) para un sitio CpG. Para la secuencia control (C4) pudimos ver que en los sitios CpGs hay dos tendencias, mostrando tanto citosinas metiladas como desmetiladas. En el caso de la secuencia correspondiente al paciente prematuro (P2), pudimos observar que presenta en todas sus posiciones citosinas desmetiladas.

La Figura 7 corresponde al gen *GK*, donde visualizamos dos secuencias con una notoria diferencia de patrón de metilación. En esta figura vemos las secuencias que corresponden con un control (C1) y un caso prematuro (P2). En la secuencia del control, vemos una

dominancia de citosinas desmetiladas (color azul, correspondiente a timina), y en el caso del paciente prematuro hay predominancia de citosinas metiladas.

En la Figura 8 se visualizan las secuencias correspondientes al control (C5) y al paciente prematuro (P2) para el gen *PIK3AP1*. Tanto para el control como para el caso del paciente prematuro no visualizamos diferencias notorias de niveles de metilación entre ambos. Esto se evidencia a partir del patrón de color, que es muy similar para las dos secuencias.

A



B



Figura 6. *MIR155HG*. **A**. Visualización de la comparación de secuencias en IGV que corresponden al control C4 y el paciente prematuro P2. **B**. Detalle de una región del promotor de *MIR155HG*. En la barra superior se visualiza la cobertura. En rojo se muestran las citosinas metiladas y en azul las timinas. En verde se señala la isla CpG de la región promotora.

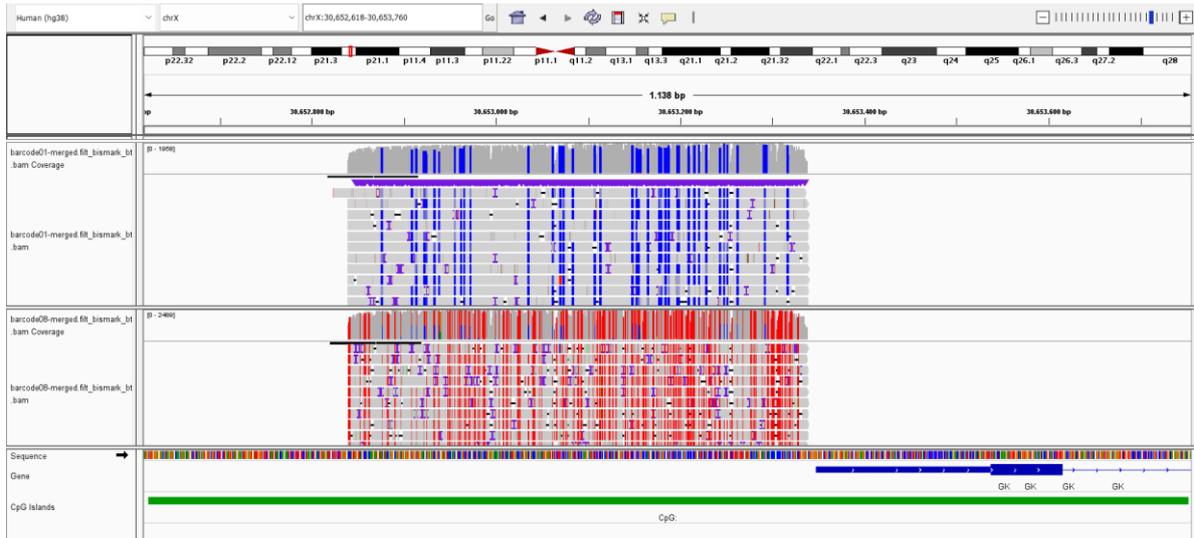


Figura 7. GK. Visualización de las secuencias que corresponden al control C1 y el paciente prematuro P2. En la barra superior se visualiza la cobertura. En rojo se muestran las citosinas metiladas y en azul las timinas. En verde se señala la isla CpG de la región promotora.



Figura 8. Visualización de las secuencias de PIK3AP1 correspondientes al control C5 y el paciente prematuro P2. En la barra superior se visualiza la cobertura. En rojo se muestran las citosinas metiladas y en azul las timinas. En verde se señala la isla CpG de la región promotora.

Luego del alineamiento y filtrado por calidad de secuenciado, realizamos el filtrado de las lecturas por cobertura, reteniendo aquellas CpGs que estén representadas por 30 o más lecturas. Eliminamos las lecturas que correspondían con alineamientos no deseados, (productos inespecíficos y/o productos de otras muestras), reteniendo aquellas lecturas que

estén alineadas en las regiones genómicas de nuestros genes de interés (Tabla 1). De esta forma se retuvieron 179 sitios CpGs para analizar: 65 sitios CpG para *PIK3AP1*, 54 para *GK* y 60 para *MIR155HG*.

c. Análisis de metilación diferencial en promotores

En el caso de los tres genes, realizamos el test estadístico de Wilcoxon, que no mostró diferencias significativas entre los grupos. Es por este motivo que realizamos un análisis comparativo de manera gráfica de los resultados.

Visualizamos gráficamente los niveles de metilación por sitio CpG para las muestras analizadas discriminando entre controles y prematuros severos. Para ello, graficamos el porcentaje de metilación de cada región promotora en función de la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción (TSS).

Para el caso del promotor del gen *PIK3AP1*, no se observa metilación diferencial entre pacientes y controles, estando la región analizada prácticamente desmetilada en todas las muestras. Los niveles de metilación tanto para controles como para prematuros severos son muy similares (Figura 9).

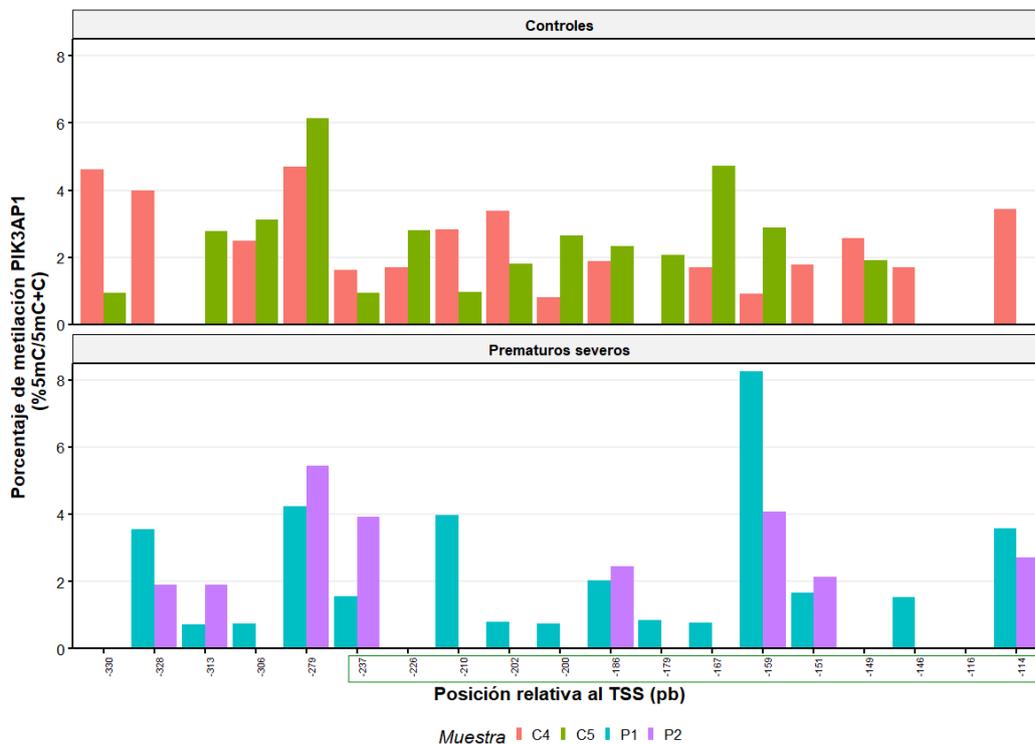


Figura 9. Nivel de metilación del promotor de *PIK3AP1* en recién nacidos pretérmino severos y a término. Se grafica el porcentaje de metilación vs. la posición relativa al TSS. El rectángulo verde delimita la isla CpG del gen.

Para el promotor del gen *GK* no se observa metilación diferencial salvo en uno de los controles donde si observamos variación de la metilación en el contexto de la isla CpG. Para un paciente control (C4) hay cuatro sitios CpGs hipermetilados, es decir que se encuentra por encima del 75%, siendo el resto de la región analizada desmetilada. A su vez, en uno de los pacientes prematuros (P2) se observa metilación diferencial en varios sitios CpGs (incluidos los 4 descritos en el control) con metilación cercana al 50% (Figura 10).

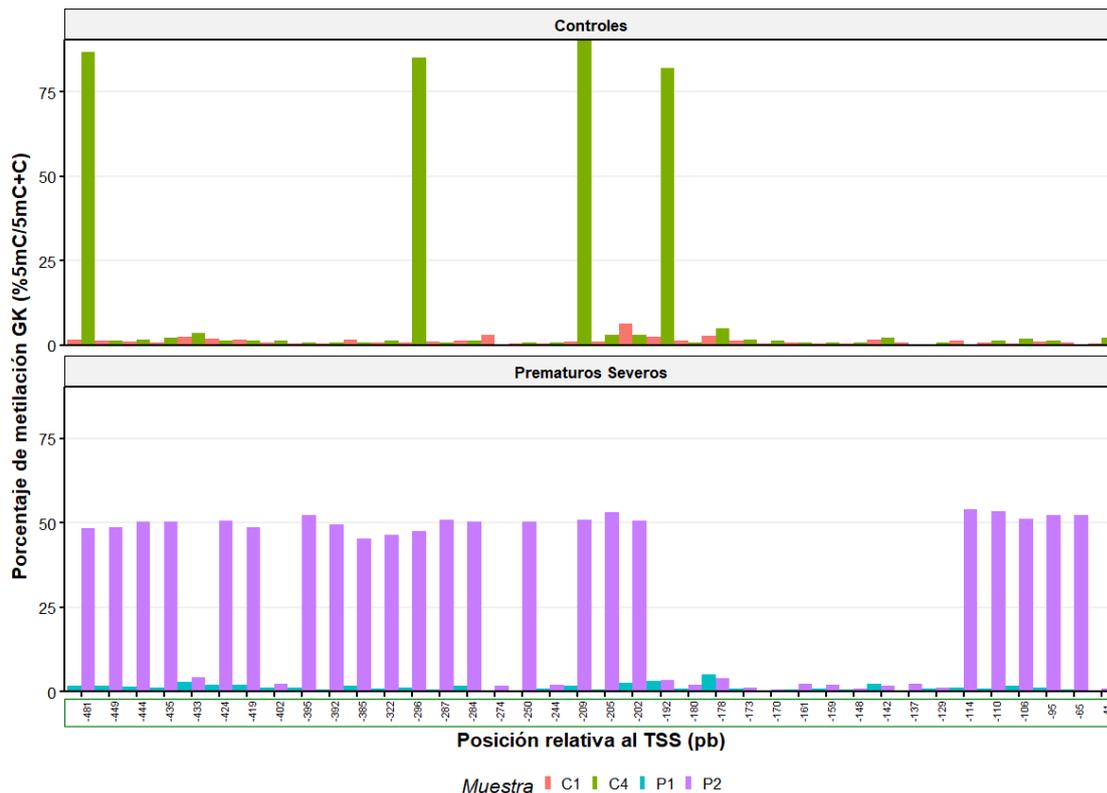


Figura 10. Nivel de metilación del promotor del gen *GK*, comparando recién nacidos prematuros severos y controles a término. Se grafica el porcentaje de metilación vs. la posición relativa al TSS. El rectángulo verde delimita la isla CpG del promotor: en este caso todas las posiciones que se ven en la gráfica están comprendidas dentro de la isla CpG.

En el caso del promotor de *MIR155HG* analizamos 4 controles y 2 pacientes prematuros, observándose hipometilación diferencial en los pacientes prematuros en la región que está comprendida dentro la isla CpG (Figura 11). Para la región analizada en el gen *MIR155HG*, podemos visualizar que en el contexto de la isla CpG, los sitios CpGs analizados en tres de los cuatro controles están metilados en comparación a iguales posiciones en los pacientes prematuros. El paciente control C5 también presenta metilación cercana al 20% pero solo en ubicaciones específicas, no visualizándose de forma uniforme como en los otros controles.

Estas regiones metiladas en los pacientes controles no tienen igual porcentaje de metilación, pero sí mantienen un mismo comportamiento o tendencia (Figura 11).

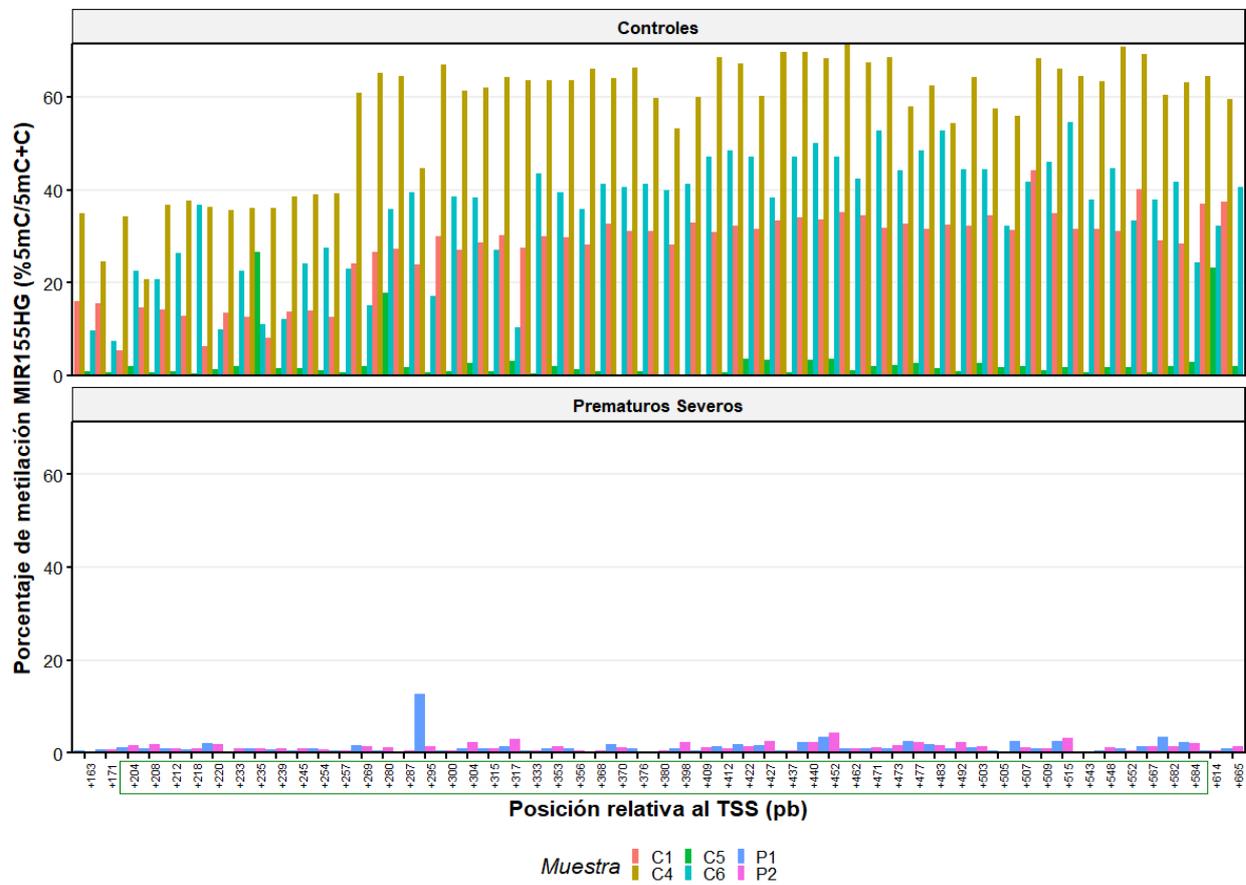


Figura 11. Nivel de metilación del promotor del gen MIR155HG en recién nacidos prematuros severos y controles a término. Se grafica el porcentaje de metilación vs. la posición relativa al TSS. El rectángulo verde marcado en el eje de la posición relativa al TSS delimita la isla CpG del promotor del gen MIR155HG.

Con este diseño experimental, a pesar de que el test de Wilcoxon no nos permitió visualizar diferencias estadísticamente significativas de metilación entre ambos grupos, sí pudimos observar diferencias cualitativas a partir del análisis gráfico de las secuencias de los genes candidatos elegidos.

Discusión:

En este trabajo se implementó el análisis de metilación de los promotores de los genes *MIR155HG*, *GK*, y *PIK3AP1*, (previamente asociados a prematurez) por secuenciación masiva dirigida, utilizando tecnología Oxford Nanopore.

Los mecanismos epigenéticos están involucrados en el control de la expresión génica. Algunas regiones promotoras de los genes, como las analizadas en este trabajo, son ricas en CpGs y su metilación está relacionada a la regulación de la transcripción génica, por ejemplo, mediante la alteración de los mecanismos de unión de factores de transcripción (Groom *et al.*, 2011). Esto se cumple para los tres genes analizados, que en sus regiones amplificadas tienen varios sitios de unión de factores de transcripción reportados, así como también potenciadores, tal como lo confirmamos en la base de datos ENCODE. Así, estos genes son plausibles de ser regulados en su expresión génica por metilación del ADN en sus promotores. La amplificación del ADN tratado con bisulfito de sodio es un método ampliamente utilizado para el análisis de metilación del ADN. Como mencionamos en la metodología, el bisulfito cambia las citosinas no metiladas (C) por uracilos (U), que en la secuenciación posterior se van a leer como timinas (T), mientras que las 5 metil-citosinas (5mC) no se modifican (Krueger *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2021). Este método es sumamente dificultoso desde el diseño de los oligonucleótidos hasta el procesamiento de los datos. El ADN tratado con bisulfito de sodio es lábil y puede tener altas tasas de degradación, debido a que se introducen roturas en la cadena de ADN, dando como resultado un ADN muy fragmentado. Esta es de las principales limitantes para estudiar modificaciones epigenéticas en regiones tratadas con bisulfito (Pappas *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2021).

Su amplificación también es dificultosa ya que la alta cantidad de homopolímeros de uracilo en el ADN tratado dificulta la amplificación no lográndose obtener fragmentos de más de 500pb (Yang *et al.*, 2015). Otra limitante es que en el procesamiento de los datos se necesita un genoma de referencia tratado con bisulfito de sodio (Pappas *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2021). En el trabajo actual, con la técnica implementada y los ajustes realizados, se lograron amplificar fragmentos de gran tamaño (entre 500 y 995pb). Debido a la limitante en el tamaño del amplicón de ADN que se puede amplificar con bisulfito de sodio, en algunas ocasiones no se pudo amplificar la totalidad de la isla CpG objetivo. En ese caso, a pesar de ello sí pudimos diseñar oligonucleótidos de tal manera que se logró amplificar dentro de la isla CpG, como es el caso del promotor del gen *GK*.

Para el caso de los genes *CES4A*, *NIBAN1*, *LAMP3*, luego de probar distintas condiciones no se logró buen nivel de amplificación como para su posterior secuenciación. Para lograrlo deberíamos volver a diseñar otro par de oligonucleótidos para probar una nueva amplificación. En el caso del promotor de *CES4A*, tiene una isla CpG de 451pb: una isla no demasiado grande que probablemente nos permita diseñar otro par de oligonucleótidos que la amplifique en su totalidad. El promotor génico del gen *LAMP3* también tiene una isla pequeña, pero fue dificultoso el diseño de los oligonucleótidos ya que la isla está muy cerca de una región de repetidos. Para los genes *GK*, *PIK3AP1*, y *MIR155HG* sí obtuvimos una adecuada amplificación que nos permitió realizar el análisis de metilación en sus promotores por secuenciación.

Los micro-ARN155 son una clase de reguladores de la expresión génica que se han relacionado al cáncer. *MIR155HG* es un gen codificante de microARN ubicado en el cromosoma 21 que juega un rol importante en la progresión, invasión y metástasis de varios tipos de cáncer, como por ejemplo en linfoma donde tiene función de oncogen (O'Connell *et al.*, 2007). *MIR155HG* también modula la respuesta inmune humana, se puede utilizar como marcador de pronóstico en múltiples cánceres y sirve para predecir el efecto curativo de la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios debido a que está estrechamente relacionado al sistema inmune (Peng *et al.*, 2019).

Existen trabajos en enfermedades con base inflamatoria que vinculan la metilación del gen *MIR155HG* con su expresión en procesos inflamatorios. Estudios como el de O'Connell *et al.* (2007) vinculan la expresión del gen *MIR155HG* con la inflamación y el cáncer, vinculando la regulación positiva de miR-155 como consecuencia de la exposición a mediadores inflamatorios. El parto prematuro espontáneo, si bien tiene causas multifactoriales, está ampliamente relacionado a procesos inflamatorios. Este gen es uno de los 270 genes diferencialmente expresados que se encontraron en el trabajo previo de Pereyra *et al.* (2019) y que dio el puntapié inicial a este trabajo.

La expresión del gen *MIR155HG* está regulada por la metilación de la isla CpG de la región promotora y está vinculada a procesos inflamatorios y a enfermedades como la artritis reumatoidea donde los niveles de metilación de la región promotora están elevados en los pacientes con artritis en comparación a los pacientes sanos (Kolarz *et al.*, 2020). En otros estudios relacionados a glioma, la expresión de *MIR155HG* está regulada por metilación de su promotor y por el factor de transcripción (SP1), encontrándose el promotor hipometilado. (Wu *et al.*, 2022). Si bien se analizan diferentes enfermedades con muestras de diferentes tejidos, la expresión del gen *MIR155HG* está dada por una diferencia en la metilación del promotor.

Analizando la metilación del promotor del gen *MIR155HG* se observó gráficamente una hipometilación en prematuros en comparación a los controles, lo cual es concordante con el aumento de expresión reportado en el trabajo previo de análisis de transcriptoma por ARNseq de Pereyra *et al.* (2019). Este gen, al igual que *GK* y *PIK3AP1*, está sobreexpresado y su valor de tasa de cambio logarítmica es mayor a 2 (Tabla 1).

Los resultados observados para el promotor de *MIR155HG* concuerdan con la posible regulación epigenética de la expresión de varios otros genes detectados en PPT en tejidos reproductivos diferentes al analizado en este trabajo. El parto pretérmino es estudiado en distintas poblaciones en el mundo, y en la literatura se describen diferentes resultados asociando la expresión génica a la metilación del ADN en diferentes tejidos reproductivos. Esto muestra que la metilación del ADN juega un papel importante en la regulación del parto. Se identificaron sitios CpGs diferencialmente metilados en placenta y tejido de cordón entre pacientes pretérminos y pacientes nacidos a término, así como también se evidenció regulación epigenética en promotores de genes diferencialmente expresados en amnios, asociándose esto a ruptura prematura de membranas (Kim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008, 2019). Kim *et al.* (2013) identificaron 61 sitios CpGs en genes autosómicos en amnios, que muestran una metilación diferencial entre el parto a término y el parto prematuro. Estos genes están principalmente relacionados con la adhesión celular, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular: todos ellos desempeñan funciones en el mantenimiento y la organización de los tejidos, destacando la importancia de las membranas fetales intactas como un factor crítico en el mantenimiento del embarazo. Recientemente, You *et al.* (2021) identificaron sitios CpGs de regiones promotoras diferencialmente metiladas de células sanguíneas de mujeres embarazadas, encontrándose un gen en particular, *VTRNA2-1*, hipermetilado asociado a aumentar el riesgo de tener un parto pretérmino. Schoorlemmer *et al.* (2020) encontraron asociación entre la metilación del ADN en placenta humana con trabajo de parto prematuro, encontrando diferencias de metilación significativas en regiones promotoras de algunos genes (hipermetilación de los genes *FLT1* y *VEGFA*). Wang *et al.* (2019) encontraron un sitio CpG en el gen *lincRNA* y 31 sitios CpG con metilación diferencial significativa asociados al parto prematuro espontáneo en placenta y cordón umbilical. La mayoría de ellos estaban hipermetilados en PPT. Wu *et al.* (2019) reportaron 994 y 296 CpGs asociados con PPT en tejido y sangre de cordón umbilical, respectivamente, de los cuales solo 10 estuvieron en ambos grupos. Los patrones de variación de la metilación del ADN pueden aparecer de manera distinta en diferentes tejidos reproductivos, ya que cada tejido puede responder de manera diferente a los factores de riesgo de parto prematuro. Las aproximaciones en cuanto a la expresión y la metilación diferencial de determinadas

regiones promotoras hacen notar la importancia de los mecanismos epigenéticos en relación con el parto pretérmino

El gen *GK* (glycerol kinase) pertenece a la familia de genes que codifican la glicerol quinasa humana y se encuentra en el cromosoma X. La glicerol quinasa cataliza la fosforilación de glicerol por ATP, produciendo ADP y glicerol-3-fosfato. Se han encontrado mutaciones en este gen que ocasionan distintas patologías, pero no fueron asociadas a PPT directamente (Amberger *et al.*, 2015; Dipple *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 1994; Sjarif *et al.*, 1998, 2004).

El gen *PIK3AP1* (phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1) se ubica en el cromosoma 10. Participa en la activación de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) en las células B y en las células NK (Natural Killers). Acopla receptores de antígeno de células B a la activación de PI3K contribuyendo al desarrollo de células B. Puede estar también relacionado con la supervivencia de las células B maduras (Lovšin *et al.*, 2020).

Para los genes *GK* y *PIK3AP1* no se observó metilación diferencial en PPT, lo que nos hace pensar que puede ser otro el mecanismo regulador de su expresión, o alternativamente, que el número de muestras analizadas es insuficiente para detectar diferencias significativas. Existen diferentes mecanismos epigenéticos reguladores además de la metilación del ADN, como son las modificaciones de histonas o expresión de ARN no codificante que podrían estar interviniendo en la expresión de dichos genes (Stephens *et al.*, 2013). Se ha descrito en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de cuello de útero y el cáncer de tiroides, una expresión alterada de *PIK3AP1* donde es regulado por microARNs (Guo *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Por ejemplo, la sobreexpresión de un tipo de microARNs regula negativamente a *PIK3AP1* inhibiendo la vía de señalización PI3K/AKT, lo que lleva a una reducción de la capacidad de proliferación, migración e invasión de las células de cáncer de cuello uterino, favoreciendo la apoptosis (Guo *et al.*, 2021).

En esta tesis se implementó un flujo de trabajo donde se destaca que el análisis epigenético desarrollado por secuenciación dirigida en Nanopore es rápidamente aplicable a otros genes de interés, en ésta y/u otras patologías. Además, este diseño permite analizar decenas de promotores génicos de varios pacientes en la misma corrida. En nuestro laboratorio la técnica ya se está implementando en algunos tipos de cáncer, donde también es importante evaluar metilación de promotores génicos.

Para continuar con la investigación de prematuros severos deberíamos reproducir este trabajo aumentando el número de muestras, para poder realizar análisis estadísticos adecuados para determinar diferencias de metilación entre ambos grupos.

Cabe destacar que no existen estudios epigenéticos previos de metilación de promotores en genes candidatos para parto prematuro en la población uruguaya. Tampoco existen estudios de metilación de promotores génicos en membranas corioamnióticas en prematuros severos reportados en bases de datos públicas a nivel internacional. Como ya describimos, nuestra población es una población mestizada con una contribución genética europea, así como también de nativo americanos y africanos (Hidalgo *et al.*, 2005; Sans *et al.*, 1997, 2021) lo que determina una composición genómica propia. Sumado a un estilo de vida y medioambiente particular, dificulta extrapolar resultados de estudios genómicos y epigenéticos realizados en otras poblaciones. Así, estos estudios continúan en una línea de investigación ya existente de relevante importancia y que podría sumar al futuro de la prevención y diagnóstico del parto pretérmino en Uruguay.

Conclusiones

En esta tesis implementamos un protocolo de trabajo para estudiar marcas de metilación en promotores génicos por secuenciación dirigida, en este caso aplicado en genes candidatos diferencialmente expresados en parto prematuro.

Nuestros resultados indican que el gen *MIR155HG* está hipometilado en el corioamnios en parto prematuro. Es factible que la metilación del ADN contribuya a la sobreexpresión de este gen reportada previamente en prematuros.

Es necesario ampliar el número de muestras de pacientes prematuros y pacientes a término para poder testear nuestra hipótesis mediante análisis estadísticos.

El diseño implementado en este trabajo es versátil y nos permitirá analizar estos promotores génicos en otras patologías y diseñar el análisis de nuevos genes en parto prematuro.

El aporte de haber logrado obtener datos epigenéticos en tres genes candidatos relacionados a parto prematuro genera las bases técnicas para seguir investigando la epigenética de esta patología en nuestra población. Así se logrará un mayor conocimiento de las bases moleculares del PPT espontáneo en nuestro país. Este conocimiento es clave para realizar un correcto manejo preventivo tanto de la madre como del recién nacido, plantear estrategias de prevención y optimizar los recursos económicos.

Bibliografía

- Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F., & Hamosh, A. (2015). OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D789–D798. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1205>
- Ambrosi, C., Manzo, M., & Baubec, T. (2017). Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, 429(10), 1459–1475. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2017.02.008>
- Andersen, G. B., & Tost, J. (2018). A Summary of the Biological Processes, Disease-Associated Changes, and Clinical Applications of DNA Methylation. *Methods in Molecular Biology*, 1708, 3–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7481-8_1/COVER
- Babenko, V. N., Chadaeva, I. V., & Orlov, Y. L. (2017). Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evolutionary Biology*, 17(Suppl 1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0864-0>
- Briozzo, L., Tomasso, G., Viroga, S., Nozar, F., & Bianchi, A. (2021). Impact of mitigation measures against the COVID 19 pandemic on the perinatal results of the reference maternity hospital in Uruguay. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 35:25, 5060-5062. <https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1874911>
- Briozzo, Leonel, Tomasso, G., Viroga, S., Selma, H., Cardozo, V., Niz, C., Nozar, F., & Bianchi, A. (2021). Effect of the unfavorable maternal–fetal environment cause by mitigation measures of the covid-19 pandemic in the public maternity of reference of Uruguay. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 35:25, 7312-7315 <https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1946791>
- Carey, M. L. and W. H. and H. P. and P. A. and M. C. and R. G. and M. M. and V. (2013). Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *{PLoS} Computational Biology*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003118>
- CHPR. (2018). *ASSE - Maternidad del Pereira Rossell continúa mejorando indicadores*. <https://www.asse.com.uy/contenido/Maternidad-del-Pereira-Rossell-continua-mejorando-indicadores-11415>
- CHPR. (2019). *Hospital de la Mujer Dra . Paulina Luisi Informe de Gestión y Sistema Informático Perinatal Año 2019*.
- CHPR. (2020). *Hospital de la Mujer Dra . Paulina Luisi Informe de Gestión y Sistema Informático Perinatal Año 2020*.
- CHPR. (2021). *Hospital de la Mujer Dra . Paulina Luisi Informe de Gestión y Sistema Informático Perinatal Año 2021*.
- Clausson, B., Lichtenstein, P., & Cnattingius, S. (2000). Genetic influence on birthweight and gestational length determined by studies in offspring of twins. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 107(3), 375–381. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.2000.TB13234.X>
- Crider, K. S., Whitehead, N., & Buus, R. M. (2005). Genetic variation associated with preterm birth: A HuGE review. *Genetics in Medicine*, 7(9), 593–604. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000187223.69947.DB>
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY149>

- Dipple, K. M., Zhang, Y. H., Huang, B. L., McCabe, L. L., Dallongeville, J., Inokuchi, T., Kimura, M., Marx, H. J., Roederer, G. O., Shih, V., Yamaguchi, S., Yoshida, I., & McCabe, E. R. B. (2001). Glycerol kinase deficiency: Evidence for complexity in a single gene disorder. *Human Genetics*, *109*(1), 55–62. <https://doi.org/10.1007/s004390100545>
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* *2004* *429*:6990, *429*(6990), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
- Fatumo, S., Chikowore, T., Choudhury, A., Ayub, M., Martin, A. R., & Kuchenbaecker, K. (2022). A roadmap to increase diversity in genomic studies. *Nature Medicine* *2022* *28*:2, *28*(2), 243–250. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01672-4>
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet* *371*(9606):75–84. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60074-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60074-4)
- Gomez-Lopez, N., Galaz, J., Miller, D., Farias-Jofre, M., Liu, Z., Arenas-Hernandez, M., Garcia-Flores, V., Shaffer, Z., Greenberg, J. M., Theis, K. R., & Romero, R. (2022). The immunobiology of preterm labor and birth: intra-amniotic inflammation or breakdown of maternal–fetal homeostasis. *Reproduction*, *164*(2), R11–R45. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0046>
- Green, C. A., Johnson, J. D., Vladutiu, C. J., & Manuck, T. A. (2021). The association between maternal and paternal race and preterm birth. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, *3*(4). <https://doi.org/10.1016/J.AJOGMF.2021.100353>
- Guo, J., Tang, T., Li, J., Yang, Y., Quan, Y., Zhang, L., Huang, W., & Zhou, M. (2021). Overexpression of MicroRNA 142-5p Suppresses the Progression of Cervical Cancer through Targeting Phosphoinositol-3-Kinase Adaptor Protein 1 Expression. *Molecular and Cellular Biology*, *41*(6), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mcb.00363-20>
- Hadley Wickham and Jim Hester. (2020). *readr: Read Rectangular Text Data* (R package version 1.4.0). <https://cran.r-project.org/package=readr>
- Hidalgo, P. C., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A., & Alvarez, I. (2005). Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetics*, *5*(3), 217–222. <https://doi.org/10.1080/09723757.2005.11885929>
- Jain, V. G., Monangi, N., Zhang, G., & Muglia, L. J. (2022). Genetics, epigenetics, and transcriptomics of preterm birth. *American Journal of Reproductive Immunology*, *88*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1111/aji.13600>
- Kim, J., Pitlick, M. M., Christine, P. J., Schaefer, A. R., Saleme, C., Comas, B., Cosentino, V., Gadow, E., & Murray, J. C. (2013). Genome-wide analysis of DNA methylation in human amnion. *The Scientific World Journal*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/678156>
- Kolarz, B., Ciesla, M., Dryglewska, M., Rosenthal, A. K., & Majdan, M. (2020). Hypermethylation of the miR-155 gene in the whole blood and decreased plasma level of miR-155 in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, *15*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233897>
- Krueger, F., & Andrews, S. R. (2011). Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, *27*(11), 1571–1572. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR167>
- Krueger, F., Kreck, B., Franke, A., & Andrews, S. R. (2012). DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nature Methods*, *9*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1828>

- Li, J., Zhang, Z., Hu, J., Wan, X., Huang, W., Zhang, H., & Jiang, N. (2022). MiR-1246 regulates the PI3K/AKT signaling pathway by targeting PIK3AP1 and inhibits thyroid cancer cell proliferation and tumor growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(3), 649–661. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04290-3>
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., & Black, R. E. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*, 379(9832), 2151–2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1)
- Lovšin, E., Kovač, J., Tesovnik, T., Toplak, N., Perko, D., Rozmarič, T., Debeljak, M., & Avčin, T. (2020). PIK3AP1 and SPON2 Genes Are Differentially Methylated in Patients With Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Adenitis (PFAPA) Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 11(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01322>
- Menon, R., Conneely, K. N., & Smith, A. K. (2012). DNA Methylation: An Epigenetic Risk Factor in Preterm Birth. *Reproductive Sciences*, 19(1), 6. <https://doi.org/10.1177/1933719111424446>
- Methyl Primer Express™ Software v1.0*. (n.d.). Retrieved November 3, 2021, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376041>
- Mitsuya, K., Singh, N., Sooranna, S. R., Johnson, M. R., & Myatt, L. (2014). Epigenetics of Human Myometrium: DNA Methylation of Genes Encoding Contraction-Associated Proteins in Term and Preterm Labor 1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 90(5), 98–99. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113209>
- Moosavi, A., & Ardekani, A. M. (2016). Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iranian Biomedical Journal*, 20(5), 246–258. <https://doi.org/10.22045/IBJ.2016.01>
- Müller, H. W. and R. F. and L. H. and K. (2021). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* (R package version 1.0.7). <https://cran.r-project.org/package=dplyr>
- O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5), 1604–1609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610731104>
- Pappas, J. J., Toulouse, A., & Bradley, W. E. C. (2009). A modified protocol for bisulfite genomic sequencing of difficult samples. *Biological Procedures Online*, 11(1), 99–112. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9010-3>
- Parets, S E, Conneely, K. N., Kilaru, V., Fortunato, S. J., & Syed, T. A. (2013). Fetal DNA Methylation Associates with Early Spontaneous Preterm Birth and Gestational Age. *PLoS ONE*, 8(6), 67489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067489>
- Parets, Sasha E, Bedient, C. E., Menon, R., & Smith, A. K. (2014). Preterm Birth and Its Long-Term Effects: Methylation to Mechanisms. *Biology*, 3, 498–513. <https://doi.org/10.3390/biology3030498>
- Peng, L., Chen, Z., Chen, Y., Wang, X., & Tang, N. (2019). MIR155HG is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration and immune checkpoint molecules expression in multiple cancers. *Cancer Medicine*, 8(17), 7161–7173. <https://doi.org/10.1002/cam4.2583>
- Pereyra, S. (2019). Análisis de la variabilidad y expresión génica en el parto prematuro espontáneo. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/26667>

- Pereyra, S., Sardina, A., Neumann, R., May, C., Bertoni, B., Sapiro, R., & Cappetta, M. (2021). *Promoter methylation analysis in candidate genes of severe preterm birth*. 3,5.
- Pereyra, S., Sosa, C., Bertoni, B., & Sapiro, R. (2019). *Transcriptomic analysis of fetal membranes reveals pathways involved in preterm birth*. *BMC medical genomics*, 12(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0498-3>
- R Core Team (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Rey, G., Skowronek, F., Alciaturi, J., Alonso, J., Bertoni, B., & Sapiro, R. (2008). Toll receptor 4 Asp299Gly polymorphism and its association with preterm birth and premature rupture of membranes in a South American population. *Molecular Human Reproduction*, 14(9), 555–559. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan049>
- Rey, Grazzia, Pereyra, S., Velazquez, T., Grasso, D., Alonso, J., Bertoni, B., & Sapiro, R. (2012). The Effect of Inflammation on Preterm Birth. *Preterm Birth - Mother and Child*. <https://doi.org/10.5772/26586>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 2011 29:1, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Romero, R., Dey, S. K., & Fisher, S. J. (2014). Preterm Labor: One Syndrome, Many Causes NIH Public Access. *Science*, 345(6198), 760–765. <https://doi.org/10.1126/science.1251816>
- Saigal, S., & Doyle, L. W. (2008). An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *The Lancet*, 371(9608), 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60136-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60136-1)
- Sans, M., Figueiro, G., Bonilla, C., Bertoni, B., Cappetta, M., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Mut, P., & Hidalgo, P. C. (2021). Genetic ancestry and social stratification in Montevideo, Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 23(1), 029–029. <https://doi.org/10.24215/18536387E029>
- Sans, M., Salzano, F. M., & Chakraborty, R. (1997). Historical genetics in Uruguay: Estimates of biological origins and their problems. *Human Biology*, 69(2), 161–170.
- Sargent, C. A., Young, C., Marsh, S., Ferguson-smith, M. A., & Affara, N. A. (1994). The glycerol kinase gene family: Structure of the XP gene, and related intronless retroposons. *Human Molecular Genetics*, 3(8), 1317–1324. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.8.1317>
- Schoorlemmer, J., Macías-Redondo, S., Strunk, M., Ramos-Ruíz, R., Calvo, P., Benito, R., Paules, C., & Oros, D. (2020). Altered DNA methylation in human placenta after (suspected) preterm labor. *Epigenomics*, 12(20), 1769–1782. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0346>
- Šerman, A., Vlahović, M., Šerman, L., & Bulić-Jakuš, F. (2006). DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. *Collegium Antropologicum*, 30(3), 665–671.
- Sirugo, G., Williams, S. M., & Tishkoff, S. A. (2019). The Missing Diversity in Human Genetic Studies. *Cell*, 177(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.048>
- Sjarif, D R, Sinke, R. J., Duran, M., Beemer, F. A., Kleijer, W. J., & Ploos Van Amstel, J. K. (1998). Clinical heterogeneity and novel mutations in the glycerol kinase gene in three

- families with isolated glycerol kinase deficiency. *JMed Genet*, 35, 650–656. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.8.650>
- Sjarif, Damayanti R., Hellerud, C., van Amstel, J. K. P., Kleijer, W. J., Sperl, W., Lacombe, D., Sass, J. O., Beemer, F. A., Duran, M., & Poll-The, B. T. (2004). Glycerol kinase deficiency: Residual activity explained by reduced transcription and enzyme conformation. *European Journal of Human Genetics*, 12(6), 424–432. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201172>
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>
- Stephens, K. E., Miaskowski, C. A., Levine, J. D., Pullinger, C. R., & Aouizerat, B. E. (2013). Epigenetic Regulation and Measurement of Epigenetic Changes. *Biological Research for Nursing*, 15(4), 373–381. <https://doi.org/10.1177/1099800412444785>
- Strauss, J. F., 3rd, Romero, R., Gomez-Lopez, N., Haymond-Thornburg, H., Modi, B. P., Teves, M. E., Pearson, L. N., York, T. P., & Schenkein, H. A. (2018). Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *American journal of obstetrics and gynecology*, 218(3), 294–314.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.009>
- Sun, Z., Vaisvila, R., Hussong, L. M., Yan, B., Baum, C., Saleh, L., Samaranyake, M., Guan, S., Dai, N., Corrêa, I. R., Pradhan, S., Davis, T. B., Evans, T. C., & Ettwiller, L. M. (2021). Nondestructive enzymatic deamination enables single-molecule long-read amplicon sequencing for the determination of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Genome Research*, 31(2), 291–300. <https://doi.org/10.1101/GR.265306.120>
- Tusnády, G. E., Simon, I., Váradi, A., & Arányi, T. (2005). BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(1), e9–e9. <https://doi.org/10.1093/nar/gni012>
- Vidal, A. C., Benjamin Neelon, S. E., Liu, Y., Tuli, A. M., Fuemmeler, B. F., Hoyo, C., Murtha, A. P., Huang, Z., Schildkraut, J., Overcash, F., Kurtzberg, J., Jirtle, R. L., Iversen, E. S., & Murphy, S. K. (2014). Maternal stress, preterm Birth, and DnA Methylation at imprint Regulatory sequences in Humans. *Genetics & Epigenetics*, 6–37. <https://doi.org/10.4137/GeG.s18067>
- Wang, H., Ogawa, M., Wood, J. R., Bartolomei, M. S., Sammel, M. D., Kusanovic, J. P., Walsh, S. W., Romero, R., Strauss, J. F., & Strauss lii, J. F. (2008). Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Human Molecular Genetics*, 17(8), 1087–1096. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm381>
- Wang, X. M., Tian, F. Y., Fan, L. J., Xie, C. B., Niu, Z. Z., & Chen, W. Q. (2019). Comparison of DNA methylation profiles associated with spontaneous preterm birth in placenta and cord blood. *BMC Medical Genomics*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0466-3>
- Wang, X. M., Tian, F. Y., Xie, C. B., Niu, Z. Z., & Chen, W. Q. (2020). Abnormal placental DNA methylation variation in spontaneous preterm birth. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1863357>, 35(24), 4704–4712.
- WHO. (2023). *Born too soon: Decade of action on preterm birth*. <https://doi.org/10.3828/liverpool/9781949979688.003.0009>
- Wickham, H. (2007). Reshaping Data with the {reshape} Package. *Journal of Statistical Software*, 21(12), 1–20. <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/>

- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wu, X., Wan, Q., Wang, J., Hou, P., Zhang, Q., Wang, Q., & Lu, X. (2022). Epigenetic Activation of lncRNA MIR155HG Mediated by Promoter Hypomethylation and SP1 is Correlated with Immune Infiltration in Glioma. *OncoTargets and Therapy*, 15(February), 219–235. <https://doi.org/10.2147/OTT.S349078>
- Wu, Y., Lin, X., Lim, I. Y., Chen, L., Teh, A. L., Maclsaac, J. L., Tan, K. H., Kobor, M. S., Chong, Y. S., Gluckman, P. D., & Karnani, N. (2019). Analysis of two birth tissues provides new insights into the epigenetic landscape of neonates born preterm. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0599-4>
- Yang, Y., Sebra, R., Pullman, B. S., Qiao, W., Peter, I., Desnick, R. J., Geyer, C. R., DeCoteau, J. F., & Scott, S. A. (2015). Quantitative and multiplexed DNA methylation analysis using long-read single-molecule real-time bisulfite sequencing (SMRT-BS). *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1572-7>
- York, T. P., Eaves, L. J., Lichtenstein, P., Neale, M. C., Svensson, A., Latendresse, S., Långström, N., & Strauss, J. F., 3rd (2013). Fetal and maternal genes' influence on gestational age in a quantitative genetic analysis of 244,000 Swedish births. *American journal of epidemiology*, 178(4), 543–550. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt005>
- You, Y. A., Kwon, E. J., Hwang, H. S., Choi, S. J., Choi, S. K., & Kim, Y. J. (2021). Elevated methylation of the vault RNA2-1 promoter in maternal blood is associated with preterm birth. *BMC Genomics*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07865-y>

Material suplementario

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	AGGTTGGAGTTTAAGTTTTGCGGCGCGGTGTAGGAAAGTATACGGCGTGTGTTGAGAGAA -----	60 0
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	AAAAATATATATACGTAATGATTACGAGAAAGGAAAGGGGAAAAATTAATTATTTCG -----	120 0
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	GCGCTTGGGTTTTTTTCGATTTTTTTTTTAAAAAGAAAAAGTTTTTTAAGTTGTAGTTT -----	180 0
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	TAAGAATAGGTAGGAGGGGGGAGAAGGGGGGGGGTGTAGAAAAGCGTTTGGTCGGT -----CTGAGTAAGGGGGGGGGTTTTAAAAAGGTTTTGGTTGTT ** * ***** * **** * **** * *	240 42
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	TATGAGTTATAAGTGAGTTATAAAAGGGTCGTACGTTCTAGGCGCGGTTTTTTGTGCG TATAATTTAAAAGTGGGAATAAAAGGGTTTTATTTTGTGGTTGGGTTTTTTGGGG ** * ** * **** * * ***** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * *	300 102
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	CGGTCGAGTTCGGTTTTAGCTCGTTTTGAGTTTGGGAAGGGAGCGGATAGCGGAGTTT GGGTAATTTGGGTTTTAGGTTTTTTGTGGTTTTGGGAAGGGAGTGGATAGGGGAGTTT ** *	360 162
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	CGAGTCGTTCTAGAGTAAGCGCGGGGAATTAAGGAGAC--GTTTTTGGTAT---TGTA TGAGTGGTTGTAATAAAAGTGGTGGGAAAATAAGGGGAAATTTTTTTGGATTGGGG ** *	415 222
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	GT--ACGTCGATTTAGTTTCGCGTTTTCTGTTCTGTTTTTTTTTTTTTTT--GAACGTGGTAGG GTTTGTGGGATTTAAGTTTGGGGTTTTGGGTTGGGTTTTTTTTTTTTAAAAAGGGAAAAG ** *	472 282
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	GACGTCGGGGATTTCCGGTGCAGGGT--TATCGTGGGTT--AA-TTGCGAGGTAA--GG GATTTTTGGGGATTTTTTGGGGGGGGGAAAAGGGGGGAAAATGGGAGAGAAAAGG ** *	527 342
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	CGGGGTAGCGCTACGTGG--TCGTGGAGTTCGGTTTTGTTTCGCGCGGTTTGGGGGTG GGGGGGGAAAGTGTATTGTGTTGGAAATGGGTTGGGTTTTGGGGGTTTGGGGGT ***** *	586 402
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	TTTTTTGGGGATTTAGTGGTGTGTTTTCGTTCGGGA--TAGAGATTGCGTTGGATGGAT-- TTTTTTGGGGAAAAAGGGGGGTTTTTTTGGGGGAAAAAAAAGTTTTTGGAAGGGTT ***** *	644 462
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	TTT--CGCGGTAGAGGTAGGGGAAGGAGGGGTGTTCGAAATTAATATTTGAGTTTTT TTTTTTGGGGAAAAAGGGGAAAAAGGGGTTTTAAAAATAAAAAATTGAATTTTT ** *	702 522
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	TT-GTAAAGTTTTTTGGATGGTGGGACGTA---TTGTATAATGGTTTGGATTAG TTTAGAAATTTTTTTGGAAGGGGGGGGAAAATTTTTCTAAAAGGGTTGGGAAAA ** *	757 582
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	TTTTTTGTTGGAGTGG---TTAGAGAGTGTGTAATAATATTAGAGGGGTA----- AATTTTTTGGGGGGGGGGTTAAAAAAAACC GCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAGCCGCG ***** *	807 642
MIR155HG_REF_metilada MIR_F_650pb	----- 807 GCGAACAC 650	

Figura suplementaria 1. Alineación de la secuencia de referencia del gen MIR155HG con el programa online Clustal Omega para confirmar la identidad del fragmento amplificado correspondiente a la región promotora.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

GK_2_GK_R.ab1	-----ATCAAAAAAATAAAAAAACACTATCACCTAACTAACCAATCAAC	48
Secuencia referencia metilada	ATTTTATATGGGGTTAATTTTAGTTAAAGGAATGATT---ATGATTATTAGGGGTTAGAT	57
GK_2_GK_F.ab1	-----CAGGATGATT---ACGATTATTAGGGGTTAGAT	30
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	AAACACAAAAAACCAAACTCAAAACAAACAAAAACAATAAAACATCACAAAAACAA	108
Secuencia referencia metilada	GTAGGGAGGTG---GGTGGGGTGTGGGAAATGTGGGAAGGTTGGGTGGGTAGGTTTATA	114
GK_2_GK_F.ab1	GTAGGGAGGTG---GGTGGGGTGTGGGAAATGTGGGAAGGTTGGGTGGGTAGGTTTATA	87
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	ACCTAAACACAATAAAAAACAACACCCACACAATAAATCACATA--AAAACCAACAAAC	166
Secuencia referencia metilada	TAGTGATTATGTTGTTGTATGATTTTGTATAGTTTATTGGAGGGAATAAGTAGTTTAT	174
GK_2_GK_F.ab1	TAGTGATTATGTTGTTGTATGATTTTGTATAGTTATTGGAGGG--ATAAGCAGTTTTAT	145
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	AAACAAC---AAAACCATCCAACCTACATAACAAAAACAAAAACAATACTACCTT---	220
Secuencia referencia metilada	ATATTTTGAGATTTTATGGAGGTGAGTTTATAGGATATTAGTGGAAAGTGTGTTTTTTTG	234
GK_2_GK_F.ab1	ATATTTGAGATTTTATGGAGGCTGAGTTTATAGGATATTAGTGGAAAGTGCAGTTTTTTT	205
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	---TAACAAACAACACTCTAACCAACAAAAAACACACTTCCACTAAAATCCTAA--	274
Secuencia referencia metilada	TTGGTT---AGGAGTGTGTTTGTAAAGGGTAGTATTGTTTTGTTTTATGTTATGT	290
GK_2_GK_F.ab1	CGCTGGTAGGGAGCGGTTGTTTGTAAAGGGAAGAATCTGTTTCTGTTTTATGGTAAGG	265
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	AACTCACCTCCATAAAAATCTCAAAATATATAAAAC-----TACTTAT-TCCCTCC	324
Secuencia referencia metilada	AGTTGGATGGTTTTGTTGTTGTTG---TTGGGT-TTTTATGTGATTTAT-TGTGTGG	344
GK_2_GK_F.ab1	AGTTGGATGGTTTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTAAATGTGATTTAATTGGCCTG	325
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	CATAA-----ACTATACAAAATCATACAACAACATAAATCACTATATAAACCTACC	375
Secuencia referencia metilada	GTTGTTGTTTTATTGTGTTTAGGTTTTGTTTTGTGATGTTTTATTGTTTTGTTTGT	404
GK_2_GK_F.ab1	GGTGGTGGTTTTAACGGGTTTAGGTTTGGTTTCGG-GAAGGTTTACGGTTTTGTTTGGT	384
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	CAACCAACCTTCCCACATTTCCACACCCACCCACCTCC-CTACATCTAACCCCTAAA	434
Secuencia referencia metilada	TTGAGTGTGGT---TTTTTGTGTTGTTGATTGGTTAGTTAGGTGATAGTG-TTTA	460
GK_2_GK_F.ab1	CCGGACGGTCTGGGTTTTTTCGCTGTTTGTGGATGGTTAGTTAAGGTGAAACGCGTTTA	444
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	AATCATAATCATTCTTTAACTAAAATTA-ACCCCAAATAAAATGCA--ATATCACCCCC	491
Secuencia referencia metilada	TTT----TTATTTTTTTGATATGTTTTGGAGTTTTGGGGTA-----	500
GK_2_GK_F.ab1	ATTT----TTATTTTTTTGATA-GTTTTGGAGTTTTGGGGTGAAAAATAGAGACCCC	499
	* * * * * * * * * *	
GK_2_GK_R.ab1	CCAAAAAATAAA 505	
Secuencia referencia metilada	----- 500	
GK_2_GK_F.ab1	CCAAAAAATAAA 509	

Figura suplementaria 2. Alineación de la secuencia de referencia del gen GK con el programa online Clustal Omega para confirmar la identidad del fragmento amplificado correspondiente a la región promotora.