



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Nueva perspectiva molecular en la asociación entre
la exposición al tabaco y el crecimiento intrauterino
restringido: los piRNAs

*New molecular perspective on the association
between tobacco exposure and restricted intrauterine
growth: piRNAs*

Autor

Álvaro García Bauto

Directora

Eva María Barrio Ollero

Facultad

Medicina

Departamento de Anatomía e Histología Humana

Año

2020

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Epigenética	7
1.1.1 Bases teóricas	7
1.1.2 Marcas epigenéticas	8
1.2 Crecimiento intrauterino restringido	12
1.2.1 Definición del CIR.....	12
1.2.2 El CIR y su relación con enfermedades crónicas del adulto	14
1.3 El consumo de tabaco y su efecto epigenético en el período intrauterino 16	
1.4 piRNA, posible biomarcador de enfermedad	18
1.4.1 Biogénesis de los piRNA.....	18
1.4.2 Elementos transponibles.....	21
1.4.3 Funciones – El silenciamiento de transposones	21
1.4.4 Más allá de los elementos transponibles.....	21
1.4.5 piRNAs en células pluripotenciales y células somáticas.....	21
1.4.6 piRNA y cáncer.....	22
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1 TIPO DE ESTUDIO	23
3.2 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	23
3.3 PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA	25
3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	33
8. ANEXOS	377
Anexo 1. Informe CEICA	
Anexo 2. Esquema piRBase v2.0	
Anexo 3. Ejemplo de uso de BLAST	
Anexo 4. Ejemplo de alineamiento piRNA-gen asociado	
Anexo 5. Ejemplo de uso de genoma UCSC	
Anexo 6. Resultados de mRNA diana	

GLOSARIO

AEBP2- AE Binding Protein

AEG – Adecuado para la edad gestacional

AGO – Proteínas argonauta

ARG 2 – Enzima argininas 2

ARHGAP11A - Rho GTPase Activating Protein 11A

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CIR – Crecimiento intrauterino restringido

CpG – Dinucleótido citosina-guanina

CTG – Consumo de tabaco en la gestación

CYP1A1 – Enzima citocromo P450

DMR – Differentially Methylated Regions

DNMT – Enzima DNA metil-transferasa

EEF1A1 - Elongation factor 1-alpha 1

EFGR - Epidermal growth factor

E2F3 - E2F Transcription Factor 3

ETs – Elementos transponibles

FAM3C – FAM3 Metabolism Regulating Signaling Molecule C

FOXO – Forkhead transcription factors

GREB1 – Growth Regulating Estrogen Receptor Binding 1

HGF – Hepatocyte growth factor

HSF1 - Heat shock factor 1

IGF-1 – Insuline-like Growth Factor 1

LINE - Long interspersed nuclear element

lncRNA – Long non-coding RNA

LTR – Repeticiones terminales largas

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinases

meCpG – Dinucleótido metilado

MeDIP – Methylated DNA immunoprecipitation

miRNA – micro RNA

MMD – Monocyte To Macrophage Differentiation Associated

MRFAP1 - Morf4 Family Associated Protein 1

MTNR1A – Melatonin Receptor 1A

mTOR - Mechanistic target of rapamycin

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NCR1 - Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1

NEM1 – Tropomyosin 3

NR3C1 – Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1

PCR – Polymerase Chain Reaction

PEG – Pequeño para la edad gestacional

PGR1 – Morf4 Family Associated Protein 1

PIGF – Factor de crecimiento placentario

piRNA – Piwi-RNA

piRISC – Piwi-piRNA complex

PIWI – proteína PIWI

PTPRD – Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D

RCIU – Retraso crecimiento intrauterino

TET – Enzimas Ten-Eleven-Translocation). Implicadas en la desmetilación activa del DNA.

TPK1 – Thiamin Pyrophosphokinase 1

TUBB – Tubulin Beta Class I

UCSC – University of California Santa Cruz – Genome browser

3'UTR – Región no traducida tres prima

VEGF – Factor de crecimiento vascular endotelial

Resumen

Introducción. El consumo de tabaco durante la gestación se asocia con la restricción de crecimiento intrauterino. Las alteraciones epigenéticas se proponen como uno de los mecanismos que participan en este proceso. En concreto, las modificaciones debidas al tabaco de los piRNAs – PIWI- interacting RNA –, podrían explicar el vínculo entre la exposición in utero y el defecto en el desarrollo embrionario.

Objetivos. Estudiar el impacto del tabaquismo en la regulación epigenética durante el desarrollo embrionario y su implicación en el retraso de crecimiento intrauterino y en la susceptibilidad de desarrollar enfermedades en la edad adulta.

Material y métodos. Los datos han sido cedidos por el grupo de investigación B19-17R, Crecimiento y desarrollo: regulación génica y ambiental, estudio en el que se ha comparado el metiloma de sangre de cordón de recién nacidos con restricción del crecimiento intrauterino y expuestos al tabaco con el metiloma de recién nacido normopeso y sin exposición al tabaco. De las regiones diferencialmente metiladas (DMRs) asociadas al consumo materno durante la gestación encontradas en promotores de piRNAs, se han seleccionado 6 piRNAs a estudio. El análisis de las características de los piRNAs seleccionados se ha realizado a través de la base de datos piRBase. Las dianas potenciales se han obtenido a través de RefSeq y la base de datos miRDB.

Resultados. Se han encontrado dianas potenciales para los 6 piRNAs, entre las que destacan, por su papel en el desarrollo fetal y placentario: piR-hsa- 10802: IGF1R (Score:97), piR-hsa-17047:EGFR (Score:72), piR-hsa- 7327:ARG2 (Score:55).

Discusión. Los resultados concuerdan con la evidencia de que el CTEG se asocia a patrones de metilación aberrantes, y sugieren una susceptibilidad singular en las secuencias promotoras de piRNAs. La posible desregulación de rutas moleculares conocidas en la patogénesis de la restricción del crecimiento sirve de pista para estudios futuros in vitro.

Palabras clave. *piRNA, Crecimiento intrauterino restringido, Consumo de tabaco en la gestación, Metilación de DNA, EGFR, IGF1R*

Abstract

Introduction. Maternal smoking during pregnancy is associated with intrauterine growth restriction. Epigenetic alterations are proposed as one of the mechanisms that participate in this process. Specifically, tobacco-related modifications of piRNAs (RNAs that interact with PIWI) could explain the link between exposure in utero and defects in fetal development.

Objectives. To study the impact of smoking on epigenetic regulation during embryonic development and its implication in intrauterine growth retardation and in the susceptibility to develop diseases in adulthood.

Material and methods. Data have been provided by research group B19-17R, Growth and Development: Gene and Environmental Regulation, a study comparing cord blood methyloma of newborns with intrauterine growth restriction and tobacco exposure and cord blood methyloma of normal-weight and not-exposed to tobacco newborns. Of the differentially methylated regions (DMR) associated with maternal smoking during pregnancy found in promoters of piRNAs, 6 piRNAs have been selected for study. The analysis of the characteristics of the piRNAs was selected through the piRBase database. Potential targets have been obtained through RefSeq and the miRDB database.

Results. Potential targets have been found for the 6 piRNAs, among which stand out for their role in fetal and placental development: piR-hsa-10802: IGF1R (Score: 97), piR-hsa-17047: EGFR (Score: 72), piR-hsa-7327: ARG2 (Score: 55).

Discussion. The results agree with the evidence that maternal smoking during pregnancy is associated with aberrant methylation patterns, and detect a singular susceptibility in the promoter sequences of piRNAs. Possible deregulation of known molecular pathways in the pathogenesis of growth restriction serves as a clue for future in vitro studies.

Key words: *piRNA, Intrauterine growth restriction, Tobacco use in pregnancy, DNA methylation, EGFR, IGF1R*

1. Introducción

1.1 Epigenética.

1.1.1 Bases teóricas

Mientras que el genoma de un mamífero tiene alrededor de 33000 genes, ninguna célula expresa todos los genes a la vez, sino un grupo reducido de ellos – con sus múltiples posibilidades de combinación –, que determina las características individuales de cada tipo celular. Los procesos que participan en esta selección de la información que marca el material genético son estudiados por la epigenética.

Se trata de un concepto controvertido por existir diferentes significados para el mismo término. Arthur Riggs y su equipo definieron a la epigenética como “el estudio de los cambios en la función de los genes mitóticamente y/o meióticamente heredables que no pueden ser explicados por los cambios en la secuencia de DNA”. En contraste, para Waddington la epigenética era el estudio de la epigénesis, esto es, cómo los genotipos forman un fenotipo en el desarrollo, definición en este momento casi obsoleta. En este trabajo se va a considerar el concepto de epigenética como el estudio de las alteraciones en la expresión de genes que no son causados por los cambios en la secuencia de DNA, a partir del cual se pretende definir cómo las exposiciones ambientales pueden alterar la expresión genética de una célula, de sus descendientes, e incluso transmitirse a la siguiente generación.(1)

Las células conservan la información en forma de secuencias de ácidos nucleicos que constituyen el DNA del genoma. Paralelamente, en las células existe otro tipo de información más allá de la secuencia genómica, responsable de la regulación de patrones de expresión génicos con capacidad de transmisión hereditaria a las células hijas, denominado epigenoma. Esta regulación sirve de control a lo largo de todo el desarrollo del individuo; desde el cigoto, al desarrollo de las células madre y a la formación de gametos. Las marcas epigenéticas, que determinan la lectura adecuada y adaptativa del genoma, en su defecto o exceso originan consecuencias diversas en el desarrollo celular.

Esto gana importancia en el periodo de desarrollo embrionario, en que, a partir de los cigotos prácticamente reprogramados, cuyas marcas epigenéticas son prácticamente anuladas para reorganizar el genoma (2), se establecen los patrones de metilación de la línea germinal y de las líneas de células somáticas, que suponen cambios celulares/tisulares conductuales adaptativos. Estos cambios, si bien son potencialmente reversibles, tienen consecuencias clínicas relevantes. Cualquier desestabilización del entorno ambiental normal puede generar por tanto alteraciones epigenéticas en esta fase del desarrollo. Así lo sugiere la evidencia emergente, que asocia el ambiente intrauterino con la modificación de marcas epigenéticas en el tejido fetal (3).

1.1.2 Marcas epigenéticas

La lectura del genoma está regulada a través de las marcas epigenéticas, que no modifican la secuencia de DNA pero sí determinan su expresión. Estas marcas incluyen la metilación de DNA, la modificación de histonas y el RNA no codificante, y tienen su actividad sobre la estructura compleja del material genético.

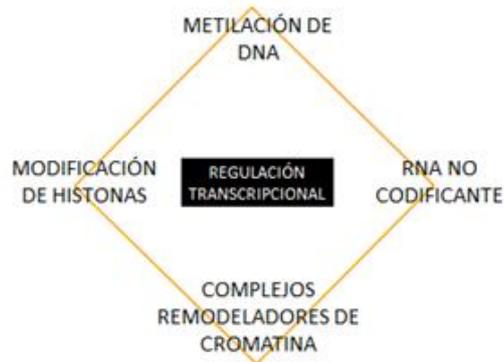


Imagen 1. Mecanismos implicados en la regulación epigenética a nivel transcripcional.

El material genético se almacena de una forma determinada. Este empaquetamiento, que condensa el genoma, es susceptible a cambios estructurales para favorecer o dificultar la transcripción, la replicación o la reparación del DNA. Los cromosomas están organizados en unidades repetidas a lo largo del DNA, los nucleosomas. Estos nucleosomas, siendo la unidad más pequeña de cromatina, están formados por un octámero de proteínas histonas – H2A, H2B, H3 y H4 – cargadas positivamente, sobre el que la doble hélice de DNA se enrolla.

Al mismo tiempo, el empaquetamiento del DNA en forma de cromatina depende de las interacciones de otra proteína histona, la histona H1, conjuntamente con proteínas de anclaje, que determinan la disponibilidad del material genético a la actividad enzimática y de factores de transcripción. Distinguimos así dos formas principales de cromatina: la eucromatina – o cromatina abierta, que contiene genes activos – y la heterocromatina – o cromatina cerrada –, que se divide en heterocromatina facultativa – diferente para cada tipo celular, con genes silenciado de importancia en otra clase de célula - y heterocromatina constitutiva – que da forma al cromosoma. Todos estos elementos jerarquizados de empaquetamiento condicionan la expresión de genes al facilitar o dificultar los mecanismos enzimáticos, que son en definitiva determinados por las marcas epigenéticas.

1.1.2.1 Metilación de DNA

El DNA puede ser modificado covalentemente por adición de un grupo metilo a un ácido nucleico. En mamíferos sólo ocurre sobre dinucleótidos CpG – citosina seguida de guanina, unidos por el enlace fosfato –. Las enzimas DNA metiltransferasas – DNMT3A y DNMT3 – establecen la metilación “de novo” sobre DNA no metilado. La DNA metiltransferasa DNMT1 reconoce el DNA hemimetilado – en la división celular – y copia la metilación en la cadena complementaria, permitiendo así la transmisión mitótica. (4)

Los CpG se encuentran fundamentalmente en islotes CpG, de los que los promotores – donde se acoplan los factores de transcripción – son regiones especialmente ricas. Por su relación con la actividad transcripcional, no suelen ser lugares de frecuente metilación. Su metilación, en cualquier caso, se relaciona con el silenciamiento de genes, al formar cromatina represiva por unión de los meCpG – dinucleótido metilado – a proteínas represoras de transcripción con capacidad de condensación de cromatina. (4)

Donde sí es frecuente la metilación, que no deja de ser un proceso mutagénico – la citosina metilada facilita la deaminación y la conversión a timina –, es en las regiones intergénicas y sobre los elementos repetitivos. La metilación en estos casos parece mantener la integridad y estabilidad genómica. En el cáncer, en estas regiones intergénicas y elementos repetitivos existe tendencia a la hipometilación, lo que facilita la inestabilidad genómica: inserciones, translocaciones y deleciones.

Estos elementos repetitivos son también identificados con el término de “elementos transponibles”. Tienen la capacidad de copiarse a sí mismos, saltar y pegarse en lugares diferentes del genoma – por medio de dos métodos: copiar-pegar, cortar-pegar –. Su presencia promueve recombinaciones ilegítimas, su replicación genera fallos en las secuencias de DNA, su inserción en sitios ajenos interrumpe secuencias codificantes y sus promotores pueden conducir a la expresión aberrante de genes vecinos.

Un ejemplo de elemento repetitivo son las LTR, o repeticiones terminales largas, que engloban o encierran regiones codificantes de proteínas que requieren para su función del elemento repetitivo. Estas regiones LTR tienen una secuencia promotora muy fuerte, asociada con CpGs; las regiones LTR terminales, contienen también un promotor fuerte rico en CpGs, siendo este lugar de riesgo. La activación de este último promotor facilitaría la transcripción de los genes posteriores o vecinos, lo cual sería mutagénico. Estas regiones de forma evidente han de ser silenciadas por metilación. (5)

De una manera prioritaria, el proceso de metilación de DNA es esencial en el desarrollo celular y del organismo. Se ha visto que en el desarrollo temprano, en el desarrollo de células germinales primordiales, y más tarde en la diferenciación celular, tienen lugar programaciones de los patrones de metilación que no requieren de la replicación para que se lleven a cabo, y que permiten la función específica de cada tipo celular a partir del cigoto original. En concreto, durante el desarrollo preimplantacional tiene lugar un *formateado* en forma de desmetilación del DNA y de reorganización de las marcas en histonas, que anula las marcas epigenéticas casi en su totalidad para reorganizar el genoma. Seguidamente, tiene lugar una metilación *de novo* que sirve de *reprogramación* epigenética por la que se establecen los patrones de metilación de la línea germinal y de las líneas de células somáticas, que suponen cambios celulares/tisulares conductuales adaptativos. Estos cambios, si bien son potencialmente reversibles, tienen consecuencias clínicas relevantes (**Imagen 2**. Cualquier desestabilización de un entorno ambiental normal en esta fase del desarrollo genera alteraciones epigenéticas. De este modo, los patrones aberrantes de metilación del DNA, vinculados a exposiciones adversas en el desarrollo embrionario, se han propuesto como factores determinantes de la enfermedad en edad adulta. (6)

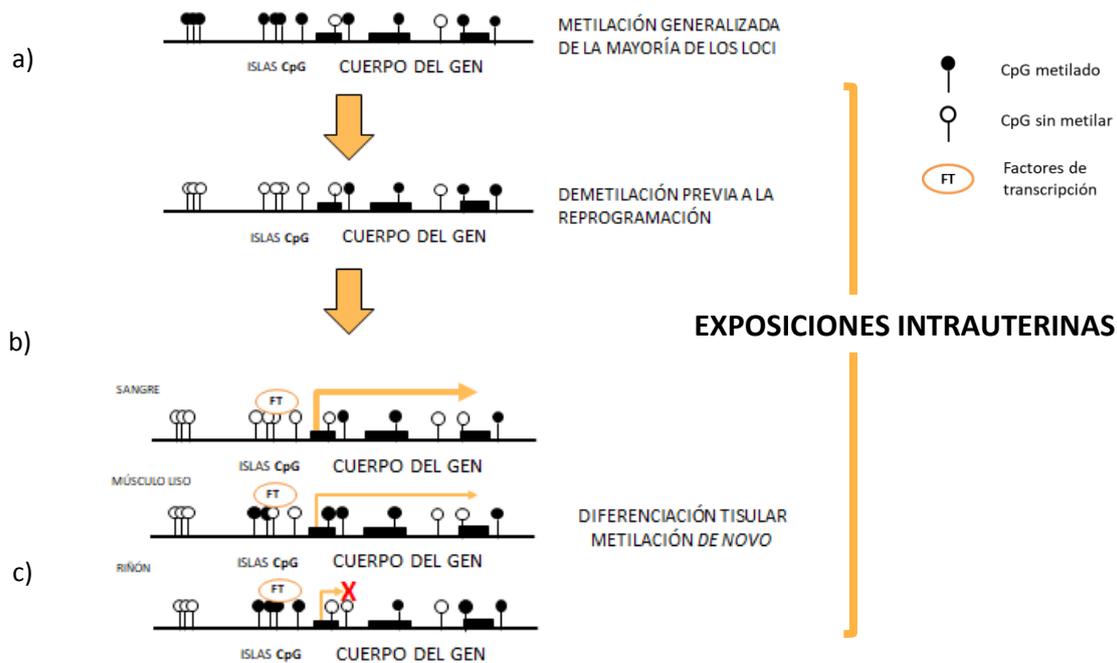


Imagen 2. Diagrama esquemático de los eventos de metilación del DNA en el desarrollo embrionario, susceptibles a las exposiciones intrauterinas. **A.** Metilación generalizada de gran parte de los loci del gameto. **B.** *Formateado* de las marcas epigenéticas por medio de la demetilación del DNA. **C.** Reprogramación epigenética a través del establecimiento de los patrones de metilación necesarios en el desarrollo y diferenciación celular. (7)

1.1.2.2 Modificación de histonas

Las histonas y sus modificaciones post-translacionales también participan en la organización de la cromatina y en la regulación de la transcripción de genes. El lugar susceptible de variabilidad en la histona, por ser más accesible a las enzimas modificantes de histonas, es su terminal amino. De la alteración de sus residuos surgen múltiples posibilidades de función, que se disponen en la hipótesis del código de histonas. De estas modificaciones, las más estudiadas son la acetilación y la metilación de los residuos lisina en las histonas H3 y H4. (2)

La acetilación se asocia con el gen activo. Al agregar un acetil al residuo lisina, se neutraliza parte de la carga positiva de las histonas. La unión de la histona y el DNA es más débil, facilitando así la acción enzimática de transcripción. Además, el acetilo puede servir de guía para el dominio denominado bromodominio de proteínas importantes en la remodelación de cromatina. La metilación de histonas, en cambio, puede asociarse con la represión transcripcional – H3K9, H3K27 – o con la activación – H3K4me –, en función de cuál sea el aminoácido afecto, y de en qué medida se haya producido la metilación – monometilación, dimetilación o trimetilación –.

La acetilación se asocia con el gen activo. Al agregar un acetil al residuo lisina, se neutraliza parte de la carga positiva de las histonas. La unión de la histona y el DNA es más débil, facilitando así la acción enzimática de transcripción. Además, el acetilo puede servir de guía para el dominio denominado bromodominio de proteínas importantes en la remodelación de cromatina. La metilación de histonas, en cambio, puede asociarse con la represión transcripcional – H3K9, H3K27 – o con la activación – H3K4me –, en función de cuál sea el aminoácido afecto, y de en qué medida se haya producido la metilación – monometilación, dimetilación o trimetilación –.

Como regla general, se sugiere que las colas de las histonas modificadas sirven de lugar de acoplamiento de proteínas importantes de la cromatina con funciones determinadas. Estas proteínas, denominadas proteínas remodeladoras de cromatina, en su mayoría ATP-dependientes, movilizan los nucleosomas – para empaquetar o liberar el DNA –, incluso pueden desmontarlos – en regiones ricas en promotores de genes –, y alterar la relación eléctrica entre el DNA y las histonas. Se plantea también su capacidad de modificar los residuos de las propias histonas. Al contrario de lo que, con mayor peso científico, se considera en torno a la metilación de DNA, los cambios en las histonas podrían no ser heredables mitóticamente. (2)

1.1.2.3 RNA no codificantes (ncRNA)

Más allá de la idea general que se tiene de la genética, por la que se estructura el funcionamiento celular en tres niveles secuenciales – DNA, mRNA y proteína codificante –, existen mecanismos intermediarios que regulan y permiten el correcto curso molecular en la célula. En concreto, la capacidad de reconocimiento de los RNA les hace posible un abanico amplio de funcionalidades en este terreno. Existe un grupo numeroso de RNAs, denominados RNAs no codificantes, capaces de regular diferentes funciones y bloquear o activar la transcripción celular, sin que en último término sean traducidos en proteínas. Se dividen en lncRNA (*long non-coding RNA*) y sncRNA (*small non-coding RNA*). Este último grupo consta de tres clases de RNA, siRNA (*small interfering RNA*), miRNA (*micro-RNA*) y piRNA (*Piwi-interacting RNAs*), siendo estos últimos el objeto de estudio del presente trabajo.

Teniendo en cuenta el reconocimiento altamente diverso de secuencias génicas, sobre las que ejercen una regulación positiva o negativa característica de cada tipo de ncRNA, en momentos determinados del desarrollo celular y en fases distintas del proceso DNA→mRNA→proteína, se puede deducir que: las modificaciones producidas por exposiciones adversas *in utero* a este nivel, esto es, las alteraciones de los patrones de metilación en estas secuencias productoras de ncRNA, u otras modificaciones epigenéticas distintas de la metilación de DNA, tengan consecuencias patológicas que pueden participar en la etiología de diversas enfermedades.

A este respecto, el propósito del trabajo es explorar el vínculo entre la exposición al tabaco *in utero* y la RCIU – extendiendo esta relación a la susceptibilidad incrementada a enfermedades en la edad adulta –, en base a las alteraciones epigenéticas específicas de los piRNAs que se han observado en los individuos recién nacidos expuestos al tabaco y con RCIU con respecto al grupo control. Los defectos en el funcionamiento de esta subclase de ncRNAs, descubierta en el 2006, cuya importancia en los procesos celulares ha crecido en la última década, podrían explicar la asociación ya referida y contribuir al desarrollo de estrategias de diagnóstico precoz y tratamiento.

1.2 Crecimiento intrauterino restringido

1.2.1 Definición del CIR

El bajo peso al nacer, definido como el peso al nacimiento menor de 2500 gramos, se ha considerado un signo de ambiente intrauterino adverso, relacionado a corto plazo con una morbilidad perinatal aumentada, y a largo plazo, con un riesgo incrementado de desarrollo de enfermedades crónicas en el adulto.

En términos de la práctica clínica, se diferencia al recién nacido pequeño para la edad gestacional (PEG) del recién nacido con crecimiento intrauterino restringido (CIR), a pesar de que en ocasiones son conceptos intercambiables que pueden ser expresión del mismo defecto. Pequeño para la edad gestacional (PEG), es un concepto estático que fotografía al recién nacido en base a la talla y el peso, y que no hace relación con un aumento de morbilidad o mortalidad perinatal.

El crecimiento intrauterino restringido (CIR), sin embargo, es un concepto dinámico que se define como la insuficiente expresión del potencial genético de crecimiento fetal, o lo que es lo mismo, la disminución de la velocidad de crecimiento *in utero* valorada en dos mediciones distintas. Se define por un percentil <3 o por percentil <10 y anomalías en la circulación feto-placentaria, medidos por ecografía. Ambos conceptos pueden, por tanto, no ser simultáneos; un recién nacido PEG no tiene por qué ser un CIR, y al contrario, un recién nacido CIR puede nacer con un peso normal. Para distinguir entre PEG y la verdadera restricción de crecimiento, se ha definido en la literatura científica como estándar a los CIR, como así lo hace la investigación previa de la que forma parte este trabajo y de la que se han obtenido los resultados necesarios para el análisis adecuado. (8)

El crecimiento intrauterino restringido, que representa un 5-10% de los embarazos anuales, se ha visto que incrementa el riesgo de morbimortalidad perinatal, siendo la segunda causa de muerte perinatal, la primera causa de parto prematuro y responsable del 30 % de los mortinatos. Se asocia también a complicaciones neonatales, como el síndrome de aspiración meconial, enfermedad pulmonar crónica, desórdenes metabólicos y hematológicos, sepsis tardía, la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal o la parálisis cerebral. Al mismo tiempo, en estudios preliminares se ha comprobado la extensión de los defectos perinatales a largo plazo, con el desarrollo de enfermedades crónicas del recién nacido con CIR (9).

En lo que respecta a su etiología, cualquier defecto en la unidad materno-fetal puede dificultar el crecimiento intrauterino adecuado. Diferenciamos entre factores fetales, maternos y placentarios.

A nivel fetal, las anomalías cromosómicas – sobre todo en CIR precoces –, síndromes genéticos – en concreto aquellas mutaciones en genes que tienen un papel en el crecimiento, como el gen productor de IGF –, infecciones o alteraciones metabólicas pueden ser factores causales.

Las causas maternas serán aquellas que dificulten la adecuada transferencia materna al feto, de forma que la perfusión uteroplacentaria insuficiente aumenta la incidencia del CIR; la preeclampsia se asocia fuertemente con la restricción del crecimiento, debido a la invasión deficiente del trofoblasto, la Diabetes Mellitus insulino dependiente con vasculopatía, la neumopatía restrictiva, las enfermedades autoinmunes o la enfermedad renal crónica se han relacionado también con el CIR. Las drogas, entre las que destaca el tabaco, participan como factores limitantes del crecimiento intrauterino. De hecho, está demostrado que el tabaco es una causa de CIR. (10)

Cualquier alteración a nivel de la placenta, como órgano fundamental de transferencia de nutrientes y gases, requerida en la eliminación de metabolitos fetales, en la protección fetal frente a patógenos sanguíneos, y también como órgano endocrino, tendrá como consecuencia, en mayor o menor medida, un crecimiento *in utero* inadecuado. El proceso placentario normal se inicia con la infiltración trofoblástica en las arterias espirales maternas, lo que permite un flujo alto y sin resistencias; a seguir, con la producción de determinados factores moleculares (PIGF, VEGF, IGF), se contribuye a la vasodilatación y angiogénesis placentaria. La insuficiencia placentaria, con la restricción en el transporte de oxígeno y nutrientes, condiciona un ambiente deficitario en el feto. (10)

1.2.2 El CIR y su relación con enfermedades crónicas del adulto

Hasta ahora muchos estudios se han centrado en el estudio de la contribución de los genes maternos y fetales en el resultado fenotípico, y en cómo la exposición genera cambios en las secuencias de estos genes. La investigación en epigenética parece aportar las respuestas necesarias en este sentido.

Como se adelantaba anteriormente, en los años 90 diversas observaciones demostraron la correlación entre resultados perinatales – bajo peso al nacer – y un aumento del riesgo de padecer enfermedades crónicas cardiovasculares, metabólicas o psiquiátricas (11, 12). Tanto en modelos animales –en condiciones de ligadura de vasos utero-placentarios, hipoxia materna, reducción de la nutrición, exposición a corticoides u otras situaciones adversas – como, en menor medida, en estudios en humanos (**Tabla 1**), se han ido sumando evidencias que refuerzan la asociación entre la exposición a factores estresantes *in utero*, y el desarrollo de enfermedades crónicas en edad adulta. Estos estudios ponen de manifiesto la variedad de cambios celulares y subcelulares inducidos por estas circunstancias alteradas (13). Las modificaciones en los procesos epigenéticos son por tanto un posible y fértil vínculo teórico en este sentido.

La hipótesis del “origen del desarrollo de la enfermedad” (14), propone que determinadas exposiciones ambientales durante el desarrollo puede causar cambios que influyen la susceptibilidad a enfermedades a lo largo de la vida, incluyendo: el ayuno, la obesidad materna, estresores maternos como la ansiedad o la depresión, el alcoholismo o el consumo de tabaco.

En base a los factores estresantes, se generan cambios en la fisiología del feto, que se corresponden primariamente con cambios en el epigenoma como parte del proceso fetal de “programación intrauterina”, y que en última instancia, son responsables de regular positiva o negativamente la expresión de genes en función de las necesidades del feto. A esto se denomina respuesta adaptativa predictiva, que actúa como vínculo entre el entorno fetal *in utero* y los patrones adultos de expresión de genes (**Imagen 3**). En el momento en el que la exposición *in utero* es persistente, las implicaciones patológicas se extienden potencialmente más allá del período intrauterino, por defectos estructurales somáticos o por un procesamiento fisiológico inapropiado. (15)

Exposición <i>in utero</i>	Tejido	Alteración de la metilación de ADN
Dieta/Nutrición		
Suplementación con micronutrientes	Cordón umbilical	Metilación alterada en dos “imprinted genes”: receptor IGF2 y MEG3
Folato y vitamina B12	Cordón umbilical	Metilación global disminuida Menor metilación del promotor IGF2
Estrés		
Depresión materna	Cordón umbilical	Mayor metilación en promotor de NR3C1, en niños
Violencia doméstica	Cordón umbilical	Mayor metilación en promotor de NR3C1, en adolescentes
Disruptores endocrinos		
Polución	Cordón umbilical	Menor metilación de DNA global
Antiepilépticos	Cordón umbilical	Menor metilación de DNA global y cambios específicos

Tabla 1: Estudios en humanos que asocian la exposición *in utero* a cambios epigenéticos a largo plazo. (7)

El principal factor que contribuye en la programación fetal alterada es el déficit de nutrientes. La restricción nutricional materna, en el intenso periodo de programación epigenética, podría promover rutas de desarrollo que se adaptaran al nuevo entorno, al seleccionar vías moleculares específicas. En este sentido, se cree que los genes *imprinted* maternos expresados, a diferencia de los paternos, tienden a la restricción del crecimiento embrionario – como mecanismo protector de la madre frente a futuras gestaciones –, y por lo tanto, las alteraciones en la metilación del DNA a este nivel podrían modificar la transferencia de nutrientes al feto. De hecho, se ha comprobado que alteraciones en la suplementación nutricional contribuyen a un defecto en la trayectoria del crecimiento intrauterino. La restricción calórica materna tiene además impacto en el flujo utero-placentario y resulta en insuficiencia uteroplacentaria, que se relaciona con el CIR. Parte de esta evidencia sugiere que esta programación alterada contribuiría a una mayor incidencia de enfermedades metabólicas (6).

Estudios en torno a patrones de metilación de CIR en comparación con gestaciones normales apoyan esta idea (16). En sus resultados se reportan diferencias entre estos los niños CIR y los niños Adecuados para la edad gestacional (AEG), sobre todo afectando a genes implicados en el metabolismo y diferenciación del tejido adiposo.

Esto sugiere una adaptación fetal a la insuficiencia placentaria, en términos de modificaciones epigenéticas. Los efectos fenotípicos de las alteraciones epigenéticas durante el desarrollo podrían además no manifestarse hasta la edad adulta (17), especialmente si afectan a rutas de genes que modulan la respuesta a los cambios del ambiente.

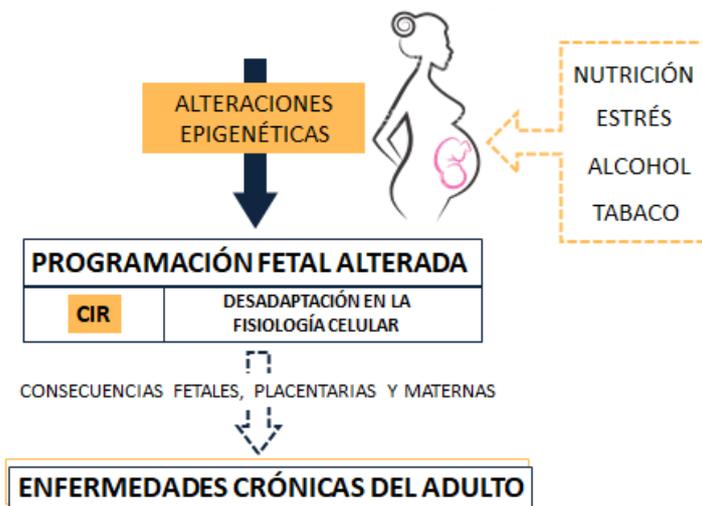


Imagen 3. Esquema propuesto de asociación entre las exposiciones intrauterinas y los mecanismos epigenéticos. Las marcas epigenéticas modificadas, como respuesta al ambiente intrauterino estresante, podrían contribuir en la RCIU y en la desadaptación celular derivada de la expresión defectuosa de genes. La fisiología celular alterada, a largo plazo, aumentaría la susceptibilidad del individuo al desarrollo de enfermedades en edad adulta.

La detección precoz de marcadores perinatales, a este nivel, puede ser útil para detectar y prevenir enfermedades crónicas *a posteriori*. En concreto, las consecuencias epigenéticas de la exposición adversa *in utero* en los niveles de piRNA, una herramienta epigenética de creciente interés en los últimos años, podrían explicar este vínculo entre el ambiente intrauterino y sus implicaciones en la enfermedad del adulto.

1.3 El consumo de tabaco y su efecto epigenético en el período intrauterino

A pesar de la evidencia de los efectos perjudiciales del consumo de tabaco en la gestación, esto continúa siendo un problema de salud pública. Estudios recientes sitúan en un 8,1% el porcentaje de mujeres europeas que fumaron en los últimos 3 meses de embarazo. Al mismo tiempo, la mujer embarazada, se ve expuesta al humo pasivo de los coches, los hogares, el lugar de trabajo o las áreas públicas. (18)

El consumo de tabaco en la gestación (CTG) está asociado con una parte importante de las complicaciones en el embarazo, tales como la placenta previa, el embarazo ectópico, el abrupto placentae o la preeclampsia, así como la muerte fetal. Al mismo tiempo, se relaciona con el parto pretérmino, el bajo peso al nacer y el síndrome de muerte fetal. A largo plazo, se asocia con malformaciones orofaciales, gastrosquisis, obesidad, y aumenta el riesgo de problemas en el niño como asma, otitis media y desórdenes neuroconductuales. (19)

Los mecanismos que explican estas asociaciones no están claros, aunque el grueso de la evidencia se centra en la hipoxia crónica fetal, la nicotina, la cotinina y el daño potencial al DNA – ciertos carcinógenos conocidos del tabaco se unen al DNA y crean mutaciones somáticas – como principales razones en torno a la relación del CTG y el CIR. En este sentido, se han identificado con éxito variantes genéticas asociadas a numerosos fenotipos en relación al consumo de tabaco. (20)

En una línea diferente, diversos estudios han encontrado diferencias en la metilación de CpGs entre fumadores y no fumadores a través de aproximaciones globales, basadas en genes candidatos o a escala genómica. Recientemente, un meta-análisis a gran escala en torno al epigenoma de recién nacidos expuestos al tabaco en la gestación identificaba en torno a 6000 sitios CpG con diferencias en la metilación. (21)

De este modo, la exposición prenatal al tabaco se asocia con la metilación de DNA en el recién nacido, y sugiere la posibilidad de que estas marcas epigenéticas pudieran servir de marcadores de exposición prenatal, así como de riesgo de desarrollo de diversas enfermedades. Pese a todo, en una parte importante de los estudios en torno a la relación entre la metilación y el peso al nacer, los resultados no son del todo coincidentes, identificando metilaciones en genes distintos. La disparidad puede deberse a las diferencias en el diseño de los estudios, en el grupo celular estudiado, en los antecedentes genéticos de la cohorte. (21)

Hasta la fecha, la asociación entre el consumo de tabaco en la gestación y la metilación específica del gen *AHRR* es el ejemplo más convincente del continuo supuesto entre la exposición específica y las diferencias de metilación en DNA. *AHRR* es un regulador negativo del gen *AHR*, que codifica una proteína con unión a xenobióticos – nicotina o cafeína –, que induce la expresión de *CYP1A1*, y que participa en la respuesta celular al tabaco – se propone como intermediario en la carcinogénesis del cáncer de pulmón promovida por el tabaco. La hipometilación encontrada en *AHRR*, su actividad aumentada y la expresión disminuida de *CYP1A1*, se proponen como mecanismos de la “programación” fetal con un papel funcional relevante. (22)

Los mecanismos moleculares que explicarían este efecto sobre la metilación de DNA del consumo de tabaco no se conocen con la evidencia suficiente. En cualquier caso, los intentos teóricos de explicarlos se aproximan desde la teoría de que el consumo tabaco provoca hipoxia intrauterina, que a su vez determina la regulación epigenética aberrante como respuesta al ambiente deficitario. En este sentido se conoce que la hipoxia crónica induce la actividad incrementada de DNMT, lo que condiciona una represión epigenética de ciertos genes. Al mismo tiempo, algunos estudios sugieren una reducción significativa en la actividad de las enzimas desmetilantes TET. (23)

Las conclusiones de estos estudios se suman a la evidencia de que el CTG está asociado con cambios en el metiloma que persisten algunos años tras la exposición prenatal, lo cual refuerza la idea de que en las primeras fases de embriogénesis, los productos del tabaco podrían inducir modificaciones de la metilación del DNA en células somáticas, que podrían mantenerse en la vida posnatal. Los cambios en la metilación inducidos por tabaco, podrían ser susceptibles de reversibilidad en función del momento de exposición y su duración. Se ha visto que el cese del CTG al inicio de la gestación – antes de la semana 12 –, se relaciona con mejores resultados perinatales con respecto al CTG persistente durante toda la gestación. (24)

Aparte de la asociación entre la metilación de DNA y efecto del humo del tabaco, se propone que otros mecanismos epigenéticos, como los mediados por miRNA, tienen un papel influyente en el papel patogénico del consumo de tabaco.

Hasta qué punto la metilación del DNA por exposición a tabaco es un mecanismo que explica la asociación con la enfermedad o sirve de marcador de una exposición determinada son preguntas todavía sin respuesta. La evidencia sugiere la asociación clara entre el CTG – como agente modificador del epigenoma fetal – y las consecuencias perinatales, en concreto, el bajo peso al nacer y su correlación con enfermedades crónicas *a posteriori*.

1.4 piRNA, posible biomarcador de enfermedad

Del total del genoma humano, el 70% se corresponde con genes transcritos. Menos de un 3 % son genes codificantes de proteínas. El resto corresponde al conjunto de RNA no codificante – lncRNA y sncRNA –, con funciones importantes en la fisiología celular. Dentro de este grupo, los más recientemente descubiertos, y también los más numerosos, son los denominados piRNAs. Fueron identificados en testículos de ratón hace más de una década, y se han encontrado presentes a lo largo de todo el reino animal (25,26) . En el genoma humano, se han identificado más de 30000 piRNAs.

Caracterizados por la metilación 2'-O-3-terminal, son RNA no codificantes, de entre 24-35 nucleótidos, que se unen característicamente a un subgrupo de proteínas, denominadas PIWI. Las proteínas PIWI pertenecen a la familia de proteínas AGO o argonautas – HIWI, HILI, HIWI2, PIWIL3 en humanos – y constan de tres dominios características: PAZ – enlaza con el piRNA guía –, MID – se une al 5'-fosfato del RNA guía – y PIWI – reconoce la secuencia objetivo del piRNA, y a través de su región RNasa, se adhiere a las posiciones 10 – 11 del RNA diana y lo degrada. En un principio, los piRNAs fueron relacionados con los elementos transponibles (ETs) y su regulación. En los últimos años se viene acumulando la evidencia que plantea nuevas funciones importantes en la regulación de la expresión génica. (27)

1.4.1 Biogénesis de los piRNA

La mayoría de piRNAs localizan para un único sitio en el genoma, incluyendo secuencias intergénicas, intrónicas y exónicas. A diferencia de mRNAs y siRNAs, que derivan de precursores de RNA bicatenarios y precisan de *Dicer*, los piRNAs son procesados a partir de precursores transcritos largos monocatenarios – en nematodos se forman a partir de sus propios *mini*-genes, en forma de precursores de 25-27 nucleótidos –. (27)

Se originan de loci genómicos denominados piRNA clusters – como lncRNA – que son indistinguibles de las unidades canónicas de transcripción de eucromatina por la RNA-polimerasa II. Los piRNAs guían a las proteínas PIWI para cortar los precursores transcritos a partir del 5' U, que posteriormente son recortados por una endonucleasa para obtener la longitud definitiva y el 2'O metilado (28) (**Imagen 4**) En mamíferos, existen además rutas alternativas en la biogénesis, denominada ruta *ping pong*, con similitudes a las que se han encontrado en *Drosophila* o en *C. elegans* con un papel específico en la embriogénesis y el desarrollo de células germinales. (27)

Los piRNAs se dividen en dos subpoblaciones observadas en la gametogénesis, que comparten características moleculares pero difieren en origen genómico, en función, en el momento de la expresión y en las proteínas PIWI; piRNA pre-paquiteno - el más precoz – y piRNA paquiteno.

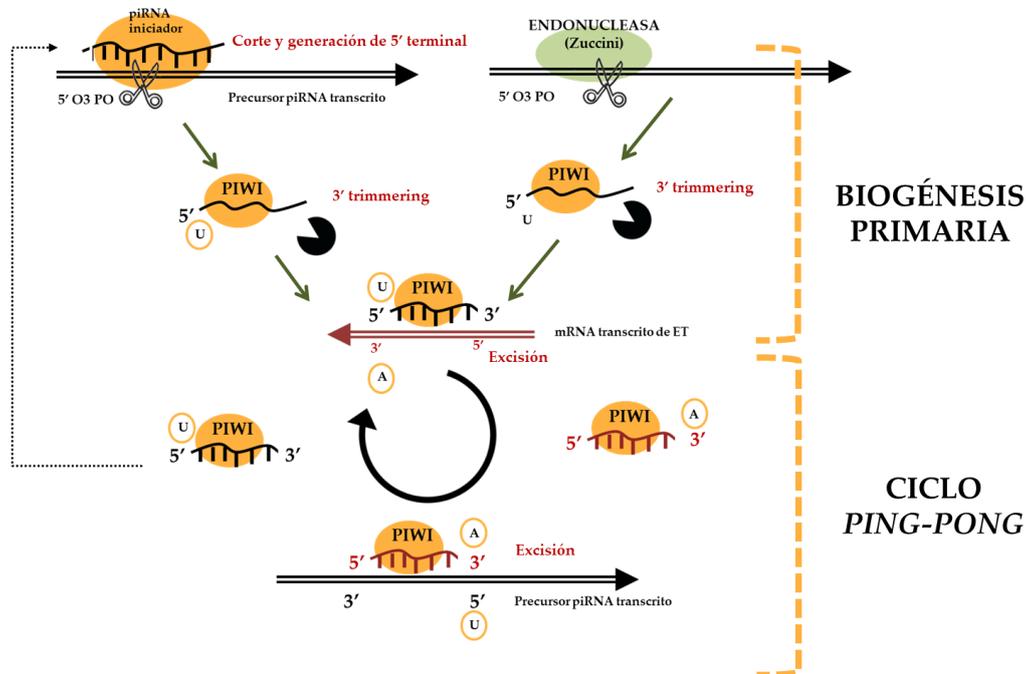


Imagen 4. Modelo propuesto unificado de las rutas de biogénesis de piRNAs. **A.** Biogénesis primaria de piRNA. El precursor transcrito de piRNA es reconocido por una endonucleasa en su extremo 5', que lo corta en su inicio. Al extremo 5' se une una proteína PIWI, que reconoce la secuencia del piRNA guía. El extremo terminal 3' es recortado por mecanismos enzimáticos para obtener la longitud funcional definitiva de los piRNAs. Se constituye así el complejo PIWI/piRNA (piRISC), con capacidad para el reconocimiento de la secuencia diana. **B.** Vía alternativa "ping-pong", que permite la amplificación y variabilidad de piRNAs. El complejo PIWI/piRNA guía (5'-U→3'), denominado piRNA iniciador, reconoce un transcrito de elemento transponible en el citoplasma en su extremo 3'-A y lo escinde. Al fragmento resultante (3'A→5') se une otra proteína PIWI para formar un nuevo complejo piRISC, con capacidad de reconocer la secuencia diana en *trans*, que será un transcrito de piRNA precursor (5'U→3'), y que formará un piRNA iniciador.

El piRNA presente en células germinales en estadios previos a paquiteno – esto es, piRNA pre-paquiteno –, incluye piRNA que participa en el silenciamiento de transposones (**Imagen 5** (29)). Esta subpoblación de piRNAs se une específicamente a las proteínas PIWI Miwi2 y Mili. Se ha visto que en ratones con Miwi2 y Mili mutantes, existe un *stop* en la espermatogénesis, con un aumento de la actividad de ETs (30). El piRNA derivado de transposones se produce a través de la vía *ping-pong* o de amplificación (**Imagen 4**), que inicia con una proteína PIWI, guiada por un piRNA iniciador – en mamíferos, procedente por herencia materna. De esta manera, se amplifica el piRNA preexistente y favorece su actividad frente a secuencias transponibles, facilitando el silenciamiento a gran escala. (27)

La mayor parte de los piRNA pre-paquiteno, sin embargo, derivan de regiones no traducidas 3-UTRs de cientos de mRNAs. Los 3'UTR son críticos en la regulación de la estabilidad, localización y traducción del mRNA. Puede que estos piRNAs actúen como reguladores complementarios del mRNA o que esto refleje una ruta alternativa de los piRNA de dirigirse a algunos mRNAs para su destrucción. Los precursores de piRNA paquiteno, producido en espermatocitos tras el nacimiento, y que representa el 95% del piRNA en el ratón adulto, se transcriben a partir de genes lncRNA de 100 nt pobres en transposones en comparación con el resto del genoma. Normalmente, de un brazo de DNA se transcribe el precursor de piRNA y de otro brazo un mRNA o lncRNA. Un estudio reciente reporta esto mismo, al comprobar que el piRNA paquiteno guía a PIWI para desestabilizar los mRNA target vía miRNA-like. (31)

En su conjunto, y como resumen, el piRNA de la célula germinal es dividido en tres clases en función de su origen: 1) piRNA asociado a ETs derivado de loci intergénicos, o *clústers*, ricos en elementos transponibles – en el caso de parte del piRNA pre-paquiteno –, 2) piRNAs asociado a mRNA derivado de regiones 3'UTR de mRNAs, y 3) piRNA derivado de lncRNA. Estas dos últimas formas de biogénesis se encuentran en una fase precoz de su comprensión.

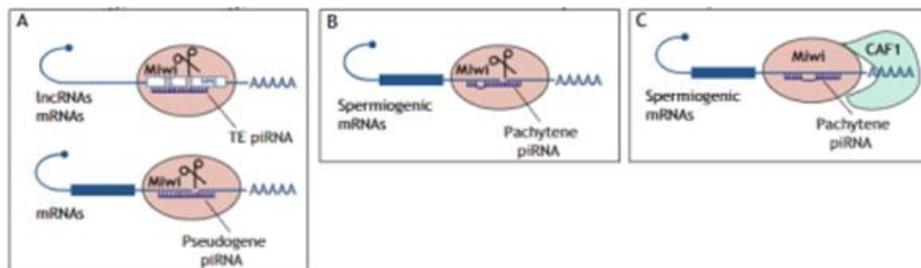


Imagen 5. Regulación de mRNA mediada por piRNAs y Miwi durante la espermatogénesis de ratón. **A.** La proporción menor de piRNA paquiteno derivado de ETs y pseudogenes se dirigen a ETs insertados en lncRNAs y mRNAs. **B, C.** piRNA paquiteno se une a mRNA espermiogénico, e induce la escisión por PIWI o el reclutamiento de CAF1 deadenilasa y degradación de mRNA.

1.4.2 Elementos transponibles

El origen ajeno a elementos transponibles, en base a las evidencias más recientes, hace sospechar de las funciones adicionales más allá del silenciamiento de transposones. La expansión evolutiva de las rutas funcionales de PIWI y piRNAs hacia un papel en la regulación de secuencias codificantes, posiblemente como consecuencia de la integración de los ETs en regiones codificantes y de regulación transcripcional, ha expandido las hipótesis en torno a la importancia funcional de estas moléculas. Son necesarios más estudios en mamíferos y en células somáticas para integrar fuera de la línea germinal los potenciales papeles de los piRNAs.

1.4.3 Funciones – El silenciamiento de transposones

En un inicio, los piRNAs fueron localizados en ratón como una nueva clase de small-RNA específicos de la línea germinal. En ensayos posteriores se desarrolló su estudio en *Drosophila melanogaster*. Su función más estudiada es el silenciamiento de transposones por degradación de los mRNAs derivados de elementos transponibles (ETs) – en este punto participa la función de *slicing* de la proteína PIWI – y, a nivel transcripcional, por metilación del DNA (32), siendo responsables del mantenimiento de la integridad del genoma en la línea germinal (33).

La regulación positiva del piRNAs, suprime a este nivel la actividad de elementos transponibles, lo que protege contra la mutagénesis, mantiene la integridad genómica, la renovación celular y la capacidad proliferativa. La inactivación epigenética de los genes codificantes de proteínas PIWI se asocia a una expresión disminuida de piRNA y un defecto de hipometilación en los loci de LINE-1, una clase de elementos transponibles, que ven su actividad mutagénica incrementada (34).

Los piRNAs podría a su vez regular la expresión de mRNAs de genes codificantes de proteínas al unirse a la región 3'UTR del mRNA diana. En este sentido, se ha visto que el piRNA paquitenos controla la destrucción masiva de mRNA – transcritos 3'UTR – en la espermiogénesis tardía (35).

1.4.4 piRNAs en células pluripotenciales y células somáticas

La expresión de piRNAs se ha identificado en células somáticas, aunque en una proporción pequeña con respecto al total de piRNAs conocidos – 1,3% del total, ubicados en transcritos ya conocidos, y no en clústers de piRNA como sí ocurre en células germinales. Pese a la menor cantidad, su presencia fuera de la línea germinal refuerza la idea de que su papel es crucial tanto en el desarrollo de la línea germinal y en la gametogénesis, como en la determinación germinal, el mantenimiento de células madre, la meiosis, la espermatogénesis y el silenciamiento de transposones a lo largo de las líneas celulares. (36)

La expresión de proteínas PIWI y de piRNAs se extiende más allá de las células madre de las gónadas. Por ejemplo, en humanos la proteína PIWI Hiwi se expresa en células madre hematopoyéticas sin todavía conocer la razón de su presencia. En consecuencia a esto, se han realizado en estudios en ratones mutantes Miwi2, Mili y Miwi en los que no se han comprobado defectos en la hematopoyesis, con lo que los piRNAs podrían no participar en condiciones normales en la regulación de esta línea de células madre. (37)

1.4.5 piRNA y cáncer

Con frecuencia se ha detectado una sobreexpresión o expresión ectópica de piRNAs y de proteínas PIWI en cánceres derivados tanto de células germinales como de células somáticas, que se ha correlacionado además con un peor pronóstico. Se ha visto que la metilación de promotores de piRNA y de proteínas PIWI supone una disrupción epigenética con consecuencias en el desarrollo celular.

Además, los patrones de expresión de los piRNAs son específicos para el tejido tumoral como para el tejido no-maligno (38). En este último estudio, se probó que en células somáticas los piRNAs expresados mapeaban a transcritos conocidos, contrario a los clusters de piRNAs reportados en la línea germinal.

Si solo se acepta la función de los piRNA en el silenciamiento de transposones, uno podría esperar que la expresión ectópica de las proteínas PIWI en el cáncer ejerciera un efecto antagonista general para el desarrollo tumoral y progresión. Sin embargo, ocurre al contrario en los estudios de piRNA en diversos cánceres en los que se ha comprobado que la expresión ectópica de PIWI favorece un comportamiento más agresivo. Esta contradicción da prueba de que el conocimiento del papel del conjunto piRNA/PIWI en el cáncer se mantiene en un momento precoz. Es posible que la expresión incrementada de PIWI sea una respuesta a la actividad excesiva de transposones en el cáncer. En contraposición, se sugiere también que la sobreexpresión o la expresión ectópica de PIWI provocaría directamente la transformación neoplásica; expresadas en tipos celulares y en momentos de desarrollo incorrectos, no solo tendrían importancia en el silenciamiento de transposones sino también en la interacción represiva con mRNAs ajenos a la línea germinal (5).

En cualquier caso, la evidencia se acumula en torno a su papel en el cáncer. Tanto el incremento como la disminución de su expresión se han relacionado con conductas celulares de *inmortalidad* celular, o al contrario, protectora frente a la tumorigénesis, en función de los genes sobre los que ejerza la regulación. Por ejemplo, el piR-021285 inhibe la proliferación e invasión en el cáncer de mama por metilación de ARHGAP11A. El piR-hsa-55490, por unión a la región 3'UTR del mRNA del gen mTOR, inhibe la proliferación de células de pulmón cancerígenas. El piR-hsa-823, al promover la fosforilación en la Ser326 de HSF1 y la fosforilación de Stat3, induce la proliferación celular y la supresión de la apoptosis. La investigación en este sentido, no solo facilita la comprensión de los comportamientos celulares en la tumorigénesis, sino que aporta pistas de las posibilidades funcionales de los piRNAs. (39)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- El consumo de tabaco en la gestación promueve la alteración de los patrones de metilación en promotores de piRNAs, de tal manera que esto participa en el desarrollo del crecimiento intrauterino.

OBJETIVO

- Estudiar el impacto del tabaquismo en la regulación epigenética durante el desarrollo embrionario y su implicación en el retraso de crecimiento intrauterino y en la aparición de enfermedades en la edad adulta
- Analizar en base a los resultados obtenidos las posibles rutas moleculares alteradas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo pretende servir de acercamiento a los piRNAs y apoyar el proceso investigativo que previamente se venía realizando en este sentido. Para el estudio del posible impacto del tabaco en la regulación epigenética mediada por piRNAs, y su contribución a la restricción del crecimiento intrauterino, se han recogido resultados de un estudio previo realizado en la Universidad de Zaragoza, con fecha de inicio el 1 de octubre de 2018, todavía en activo.

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio longitudinal observacional de casos-controles del efecto del tabaco en la modificación del patrón epigenético y su relación con el retraso de crecimiento intrauterino. La población a estudio son los recién nacidos en el Hospital Clínico Lozano Blesa y el Materno Infantil.

La muestra a estudio está formada por la sangre de cordón de recién nacidos de madres fumadoras y de madres no fumadoras; dos años después, en consulta de revisión pediátrica, se recogen los datos de peso y talla y se obtiene una segunda muestra de sangre para el estudio genético de la persistencia o no de diferencias encontradas entre los grupos.

Los datos de los piRNAs utilizados en este trabajo son resultados de investigación obtenidos por la Dra Barrio, el Dr. Lerma y la Dra. Gascón que pertenecen al grupo de investigación B19-17R crecimiento y desarrollo: regulación génica y ambiental (PI Dr. Labarta). De forma que su uso para este trabajo no suponga un perjuicio para su uso posterior. (**Anexo 1**).

3.2 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Criterios de inclusión. Se considera exposición al tabaco el consumo de más de 10 cigarrillos por día en el 1er trimestre. **Tabla 2.**

GRUPO DE RECIÉN NACIDOS EXPUESTOS AL TABACO		GRUPO DE RECIÉN NACIDOS NO EXPUESTOS AL TABACO	
CIR (diagnosticado por ecografía 3er trimestre y confirmación de bajo peso al nacer)	NO CIR	CIR (diagnosticado por ecografía 3er trimestre y confirmación de bajo peso al nacer)	NO CIR

Tabla 2. Criterios de inclusión. Caso: Recién nacido CIR y expuesto a tabaco. Control: Recién nacido no CIR y no expuesto a tabaco.

Criterios de exclusión. Enfermedad de la madre que pueda ocasionar RCIU, infecciones uterinas, malformaciones del feto, alteraciones cromosómicas, parto prematuro y no firmar el consentimiento informado.

Selección de la muestra. Se realiza muestro de conveniencia, incluyendo de manera consecutiva aquellos recién nacidos que cumplan criterios de inclusión hasta alcanzar el tamaño muestral. Teniendo en cuenta datos epidemiológicos, la muestra está constituida por un total de 120 recién nacidos.

Grupo de expuestos al factor de riesgo (n=60): sin retraso del crecimiento (n=30), con retraso de crecimiento (n=30).

Grupo no expuesto al factor de riesgo (n=60): sin retraso del crecimiento (n=30), con retraso de crecimiento (n=30).

Variables a estudio. Obtenidas de la historia clínica o mediante un cuestionario elaborado para el estudio.

Relativas a la madre		Relativas al padre
Exposición al factor de riesgo humo de tabaco (nº cigarrillos/día durante el primer trimestre/todo el embarazo)		• Hábito tabáquico del padre
Factores que podrían influir en las variables del estudio:	Ingesta de ácido fólico	Relativas al recién nacido
	Aporte multivitamínico	Sexo
	Factores de riesgo (estrés materno, diabetes, hipertensión)	Peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento
	IMC materno antes del embarazo	Peso, longitud y perímetro cefálico a los dos años
	Paridad	Edad gestacional en el momento del parto
	Años de la madre	
Consumo de alcohol y drogas		
Variables relativas a las modificaciones epigenéticas que serán estudiadas		
Porcentaje de CpG metiladas por región génica en el momento del nacimiento y a los dos años		

Tabla 3. Variables a estudio.

3.3 PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA

La selección de pacientes que cumplen criterios de inclusión se realiza en la consulta de obstetricia de manera consecutiva, previa firma del consentimiento informado. La muestra de sangre de cordón umbilical – células madre hematopoyéticas (40) se obtiene en Hematología tras el parto y antes del alta hospitalaria. Posteriormente la muestra se congela para la extracción de DNA. Como previamente ya se han seleccionado los genes de estudio mediante el análisis del MeDIP seq (Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing), se analizan y validan los genes candidatos por pirosecuenciación.

Secuenciación MeDIP de las muestras. Imagen 8. Las muestras de DNA fueron fragmentadas con un Bioruptor Diagenode en un rango de tamaño de ~ 200-800 pb. En torno a 1 ug del DNA fragmentado fue preparado para la secuenciación por Illumina HiSeq 4000, que se desarrolla en este orden de pasos:

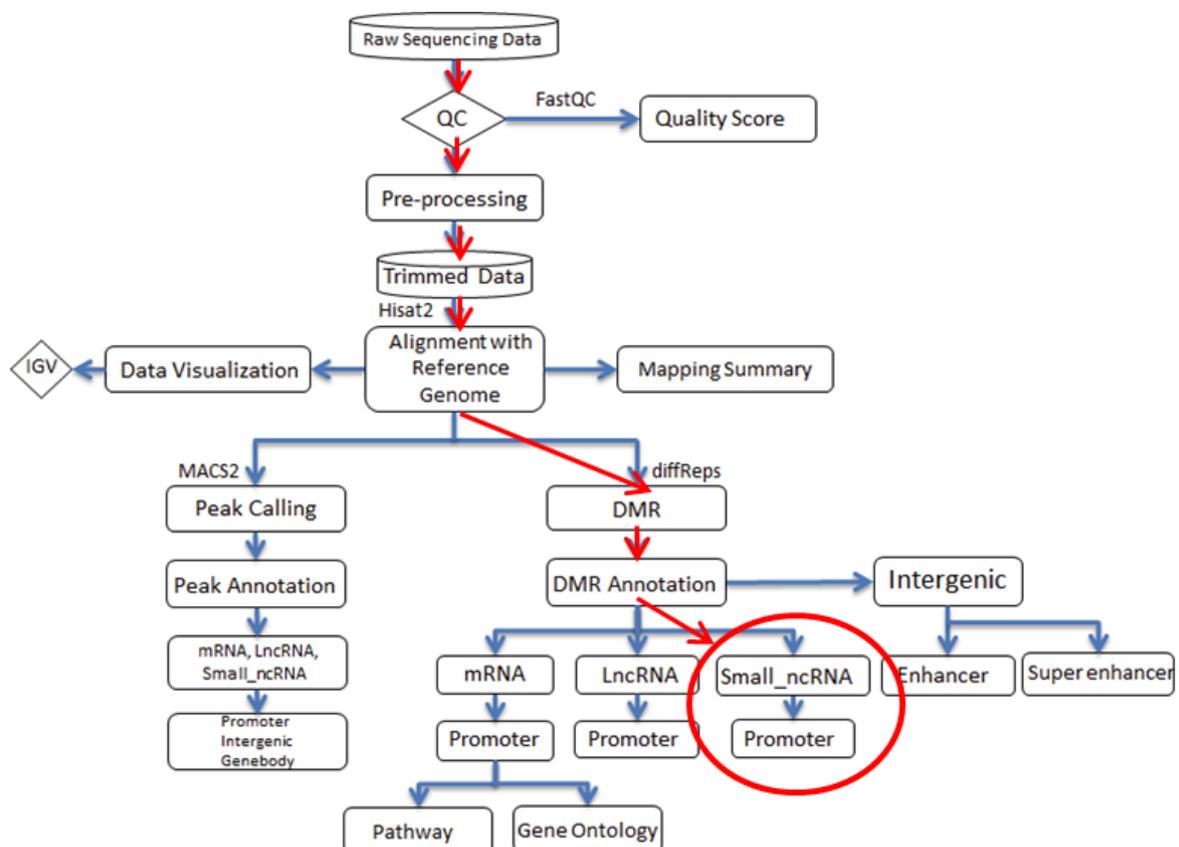


Imagen 8. Algoritmo de la secuenciación Me-DIP

3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se cuantifica el porcentaje de metilación de las citosinas de las secuencias promotoras de los genes estudiados y se compara si existen diferencias en relación con el hábito tabáquico y/o el RCIU.

Análisis bioinformático. Bases de datos. Para el análisis de los resultados obtenidos por secuenciación MeDIP de las muestras a estudio, se ha usado la base de datos actualizada en 2018 piRBase (<http://www.regulatoryrna.org/database/piRNA/>) como recurso pivote en el trabajo – **Anexo 2**. Se ha elaborado un esquema que estructura el análisis realizado (**imagen 9**).

Como se ha analizado en otros estudios que consideran reglas de complementariedad semejantes a las que dirigen a los miRNA (28,41), para la identificación de dianas en mRNAs o lncRNAs se va a recurrir al algoritmo facilitado por la base de datos miRDB (<http://mirdb.org/index.html>).

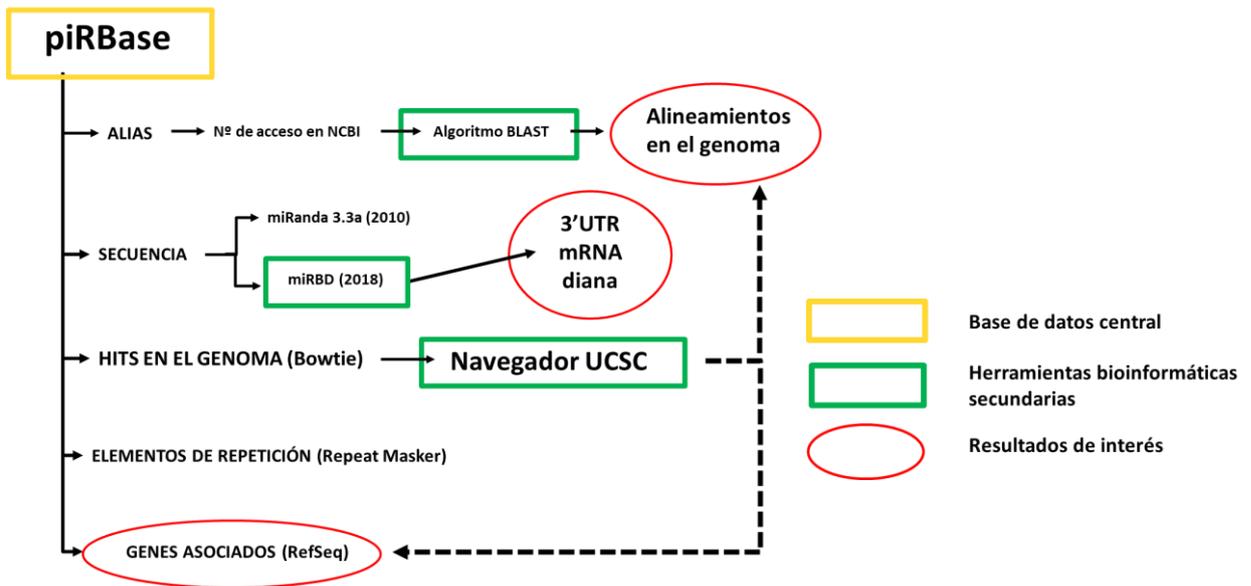


Imagen 9. Esquema propuesto del análisis bioinformático de piRNAs

Análisis de rutas moleculares. Se realiza una revisión bibliográfica para identificar de los genes diana encontrados, genes asociados previamente con el RCIU. Además, para el estudio de las rutas moleculares implicadas se emplean las páginas web Kegg Pathway (<https://www.genome.jp/>) y The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>).

4. RESULTADOS

Diferencias en patrones de metilación en secuencias promotoras de piRNAs en el recién nacido de madre fumadora

En los resultados obtenidos de la secuenciación MeDIP de las muestras de DNA, se han detectado por diffReps (corte: $\log_2FC \geq 1$, valor de $p \leq 10^{-4}$) entre el DNA de las muestras de recién nacidos de madre fumadora y PEG y el DNA control, diferencias estadísticamente significativas en la metilación de promotores de lncRNA, mRNA y snRNA.

Selección de los piRNAs a estudio

De los piRNAs encontrados con diferencias en la metilación de sus promotores se realiza una selección de 6 piRNAs, en base al menor número de loci o *hits* en el genoma detectados a través de Bowtie, para facilitar el estudio individualizado y el posterior análisis de las implicaciones en la fisiología celular. El grupo definitivo está constituido por: piR-hsa-7096, piR-hsa-17047, piR-hsa-32221, piR-hsa-3315, piR-hsa-10802 y piR-hsa-1657 (**Tabla 2**).

Nombre del gen	Loci en hg38	Cromosoma (DMRs)	Nt	Valor de p	Valor de q
piR-hsa-7327	7	<ul style="list-style-type: none"> • chr3 • chr9 • chr14 	27	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0000001446186517 • 0,0000001446186517 • 0,000000041371186 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0004210280248 • 0,0004770238281 • 0,0003555843381
piR-hsa-32221	8	<ul style="list-style-type: none"> • chr3 • chr9 • chr14 	25	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0000001121574378 • 0,0000001446186517 • 0,000000041371186 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0004210280248 • 0,0004770238281 • 0,0003555843381
piR-hsa-17047	7	<ul style="list-style-type: none"> • chr6 • chr9 	26	<ul style="list-style-type: none"> • 0,000000146768457 • 0,0000003805425021 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0004770238281 • 0,0008835059191
piR-hsa-3315	1	<ul style="list-style-type: none"> • chr4 	32	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0000000391412646 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0003489730524
piR-hsa-10802	9	<ul style="list-style-type: none"> • ch6 	26	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0000003283994532 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0007949464926
piR-hsa-1657	1	<ul style="list-style-type: none"> • ch19 	29	<ul style="list-style-type: none"> • 0,00000002637249028 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,0003419251053

Tabla 2. Caracterización de los piRNAs seleccionados en base a alias, número de locus, locus, número de nucleótidos y valores estadísticos de las DMRs.

Identificación de piRNAs derivados de genes. Tabla 3

Los piRNAs participan en la degradación de mRNAs y regulación de lncRNAs (27). En base a esta evidencia, hipotetizamos que la expresión del gen diana podría estar inversamente correlacionada con su correspondiente piRNA asociado. Se han seleccionado los piRNAs que derivan de genes codificantes de proteínas.

Al contrastar los genes asociados con el algoritmo BLAST facilitado por el NCBI, se han encontrado genes adicionales asociados y potenciales dianas para cada piRNA – ejemplo del empleo de BLAST en **Anexo 3**. La ventaja de usar directamente BLAST vía NCBI es que aporta una fotografía de la correspondencia de nucleótidos que justifica el vínculo sugerido por las bases de datos (**Anexo 4**).

Al mismo tiempo, a través del navegador del genoma UCSC, se confirma por la visualización de complementariedad los alineamientos observados, y se obtiene además información en torno a la expresión génica de cada gen resultado – ejemplo del empleo del buscador UCSC y del banco de genes GTEX (Genotype-Tissue Expression Project) en **Anexo 5**.

Identificación de mRNA diana a través de miRDB.

Teniendo en cuenta la posible interacción mRNA:piRNA que se ha descrito en diversos estudios, el siguiente paso a realizar sería la predicción del mRNA diana de los piRNAs de la muestra (35). En el trabajo, estas dianas se han identificado a través del algoritmo facilitado en la base de datos miRDB (<http://mirdb.org/index.html>).

Esta relación se basa en el ejemplo de otros estudios que también presuponen el modelo de complementariedad *miRNA-like* de los piRNAs a nivel del mRNA y se sirven de este vínculo para la búsqueda de dianas moleculares (41). Los resultados obtenidos se recogen en el **Anexo 6**.

Se muestra en la siguiente tabla (**Tablas 3 y 4**) una selección de las dianas mRNA, en genes ya estudiados en el contexto de la patogénesis del crecimiento intrauterino restringido. El score refleja la confianza estadística de los resultados predichos.

Nombre del gen	Genes asociados por RefSeq
piR-hsa-7327	NEMF1 PTPRD GREB1
piR-hsa-32221	GREB 1 ANKRD28 E2F3 PTPRD
piR-hsa-17047	AEBP2 EEF1A1 TPK1
piR-hsa-3315	MRFAP1 PGR1
piR-hsa-10802	TUBB
piR-hsa-1657	NCR1

Tablas 3. (3) Genes asociados a los piRNAs a estudio por RefSeq.

piRNA	GEN	NOMBRE	SCORE
piR-hsa-7327	ARG2	Arginina 2	55
piR-hsa-32221	FAM3C	Metabolism Regulating Signaling Molecule C	80
	NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1	88
piR-hsa-17047	MMD	Monocyte to macrophage differentiation associated	100
	HGF	Hepatocyte growth factor	92
	EGFR	Epidermal growth factor receptor	72
piR-hsa-10802	IGF1R	Insuline like growth factor 1 receptor	97

Tabla 4. Selección de mRNAs dianas con relevancia en el CIR.

5. DISCUSIÓN

Hasta ahora, la asociación entre el CTEG y el desarrollo de enfermedades a largo plazo no se había estudiado desde el punto de vista de las alteraciones epigenéticas al nivel de los piRNAs. En la última década, los avances en el estudio en torno a estos sncRNA sugieren funciones importantes más allá de la célula germinal. Su presencia en células somáticas y las consecuencias fenotípicas de su expresión aberrante en el cáncer, plantean además aplicaciones clínicas potenciales en la prevención, el diagnóstico precoz y el tratamiento de diversas enfermedades. A partir de los resultados obtenidos por secuenciación MeDIP del proyecto realizado por el grupo multidisciplinar de la DGA B19-17R: Crecimiento y desarrollo: Regulación genética y ambiental y realizado en la Universidad de Zaragoza, en torno a las diferencias en los patrones de metilación de los recién nacidos de madre fumadora y PEG frente a los recién nacidos de madre no fumadora y AEG, hemos seleccionado el total de DMRs halladas en secuencias promotoras de piRNAs para realizar un análisis de las diferencias obtenidas y sus posibles consecuencias moleculares. En los recién nacidos PEG y con exposición al tabaco se han identificado diferencias significativas en la metilación de small ncRNA, siendo especialmente llamativas en secuencias promotoras de piRNAs, con una tendencia moderada a la hipermetilación. Los resultados concuerdan con la evidencia de que el CTEG se asocia a patrones de metilación aberrantes, y sugiere una susceptibilidad singular en las secuencias promotoras de piRNAs.

Puede inferirse que el defecto provocado por el tabaco en la regulación mediada por piRNAs de genes con presencia relevante en el desarrollo y crecimiento intrauterino, podría ser parte de la fisiopatogenia de la restricción del crecimiento intrauterino. Más aún, podría explicar la asociación comprobada entre el CTEG y el desarrollo de enfermedades en el adulto.

En el trabajo se han seleccionado 6 piRNAs con DMRs hipermetiladas – piR-hsa-7096, piR-hsa-17047, piR-hsa-32221, piR-hsa-3315, piR-hsa-10802 y piR-hsa1657 –. En el análisis de la posible regulación entre el piRNA obtenido y el gen asociado, se parte de la idea de que la hipermetilación de los promotores de los piRNA-derivados de genes implica una menor expresión del piRNA, y en consecuencia, una menor actividad en la regulación de sus genes asociados. El estudio bibliográfico de los avances en la comprensión de las funciones de los piRNAs permite sugerir que la consecuencia molecular será la sobreexpresión de estos genes.

En el primer grupo de búsqueda de dianas (**Tabla 3**) se identifican, tanto en intrones como en exones de genes codificantes de proteínas, alineamientos con los piRNAs a estudio que sugieren una regulación cuyos mecanismos han de ser demostrados *a posteriori*. Un estudio reciente sugiere que la sobreexpresión del piR-015520 en células prostáticas cancerígenas, un piRNA cuyo locus se corresponde con el intron 1 del gen del receptor 1A de la melatonina humana (MTNR1A), tiene como consecuencia la represión en la expresión de MTNR1A, existiendo entre sí una regulación dependiente de concentración (42). En base a esta idea, se podría sugerir que la alteración en el nivel de expresión de un piRNA podría influir en la expresión del gen en el que está localizado, por mecanismos por el momento desconocidos.

Como segundo paquete de resultados, los mRNAs diana obtenidos a través del segundo método de targeting sugieren una diversidad amplia de interacciones entre piRNAs y sus posibles dianas, que se limitan en nuestro trabajo a 6 piRNAs. El análisis bioinformático revela rutas moleculares potencialmente alteradas, que incluyen genes que participan en el crecimiento celular y señalización por kinasas (IGF-1R, EGFR, HGF, NR3C1) y en el ciclo celular (E2F3) (**Imagen 10**).

IGF-1 es una hormona polipeptídica expresada fundamentalmente en hígado, pero virtualmente secretada en cada tejido de forma autocrina/paracrina. Al unirse a su receptor IGF-IR, activa la ruta Akt que envuelve a mTOR, MAPK, FOXO, Grb2 y otros sistemas de señalización que intervienen en la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular. El defecto en la expresión de IGF-1 se ha relacionado con la RCIU, y el estudio de los patrones alterados de metilación de DNA se ha vinculado con un crecimiento intrauterino inadecuado. Por otro lado, EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico – EGF, un polipéptido formado por 53 aminoácidos con actividad mitógena – se ha relacionado con el RCIU, de forma que cambios cuantitativos en la distribución placentaria podrían estar asociados con la secreción de EGF y con cambios en la expresión placentaria del gen EFG. La evidencia acumulada sugiere que la supervivencia del trofoblasto y su capacidad invasiva dependen de esta ruta molecular. (43)

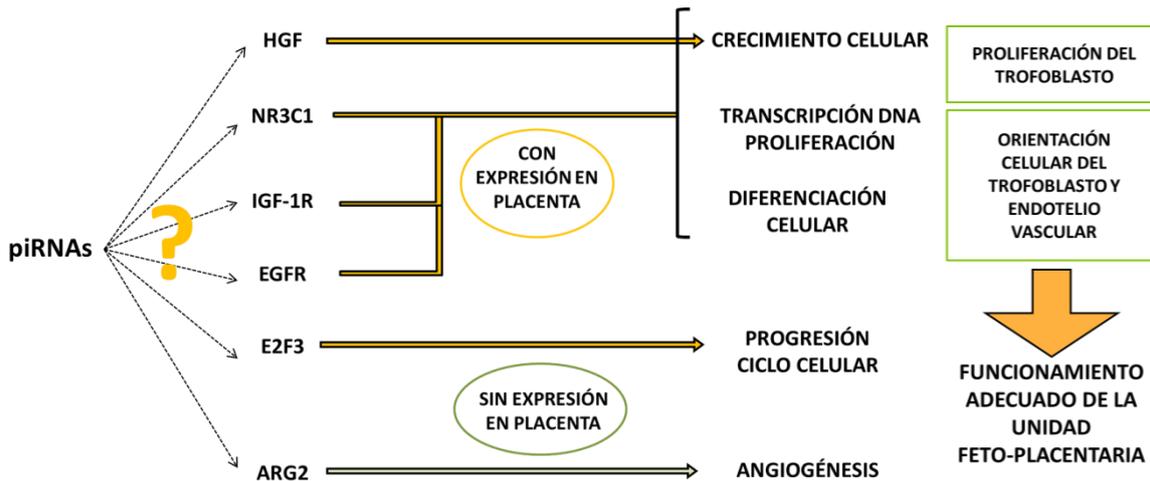


Imagen 10. Rutas moleculares relacionadas con los genes dianas de los piRNAs estudiados. Los genes dianas presentan una menor expresión en la placenta de recién nacidos CIR. El mecanismo que ejerce el piRNA sobre la expresión de los genes diana no se conoce. (43,44)

El hecho de que el grupo de recién nacidos expuestos al tabaco y RCIU presente hallazgos de desregulación de genes principales en el desarrollo fetal intrauterino, en relación a la expresión aberrante de los piRNAs que los reconocen, nos permite plantear una hipótesis patogénica de la restricción del crecimiento.

La interacción molecular entre el piR-hsa-10802 – EGFR y el piR-hsa-17047 – IGF-1, sin embargo, y teniendo en cuenta las funciones propuestas en torno a los piRNAs, sugieren una regulación negativa. En este caso, el silenciamiento del piRNA regulador tendría como consecuencia una mayor expresión del gen, y por lo tanto, un incremento en las concentraciones de EGFR y de IGF-1. Pese a ello, estudios moleculares *in vitro* podrían resolver este problema, al cuantificar la expresión los piRNAs asociados a IGF-1 y a EGFR, y la expresión de sus genes y mRNAs en placenta.

Por otro lado, entre los genes obtenidos del estudio de mRNA diana, destaca el gen **ARG2**, que codifica para la arginina 2 y cuya expresión se ve influida por la hipoxia tisular. Esta proteína regula negativamente la síntesis de óxido nítrico y se ha visto incrementada en el CIR. Como hipótesis, la sobreexpresión de esta proteína podría deberse al silenciamiento epigenético del piRNA que lo regula – piR-hsa-7327 – , de modo que existiese un descontrol regulatorio. El consumo de tabaco en la gestación, por tanto, promovería la metilación aberrante del piR-hsa-7327, y en consecuencia una actividad excesiva de esta enzima (45). Se propone un modelo de interacción piRNA:mRNA en la **Imagen 10**, que se justifica en el potencial papel de los piRNAs en la metilación de DNA de genes codificantes de proteínas (46).

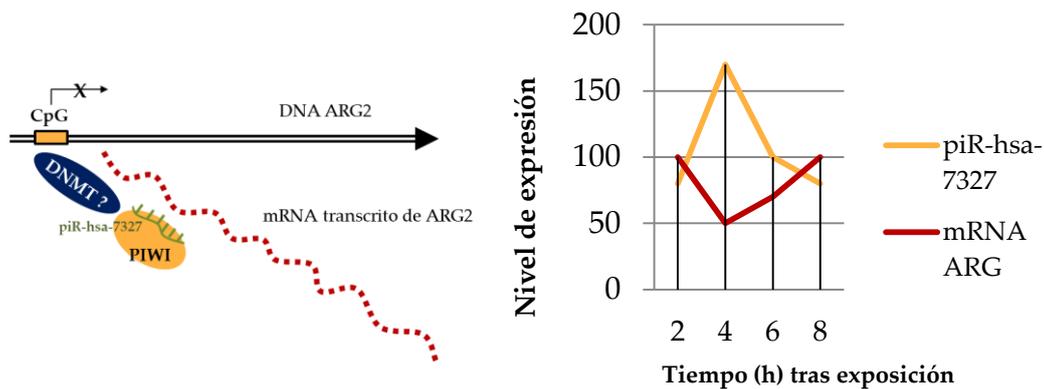


Imagen 11. A. Modelo hipotético propuesto del efecto regulatorio que ejerce el piR-hsa-7327 sobre la expresión de ARG2, en base a la evidencia que sugiere un papel regulatorio de los piRNAs por unión a dianas de mRNA. El complejo piR-hsa-7327 / PIWI se une al mRNA transcrito naciente y recluta a factores de metilación (tales como DNMTs) para regular el promotor del gen ARG2. B. Supuesto de correlación entre un aumento de expresión del piR-hsa-7327 y la concentración de mRNA.

A partir de estos resultados, la interacción molecular será comprobada a través de estudios *in vitro* que evalúen la relación entre el piRNA y su gen asociado. En este sentido, los hallazgos podrían guiar una investigación posterior que mostrara las alteraciones fenotípicas debidas al defecto que el tabaco ejerce en la expresión diferencial de piRNAs.

En estos momentos, a falta de un software computacional con la capacidad de analizar la interacción molecular de un piRNA determinado, la hipótesis de targeting basada en el papel miRNA-like podría ser una aproximación oportuna. Un filtrado más exigente, estudiaría los emparejamientos entre el conjunto de piRNAs con DMRs encontrados y los mRNAs y lncRNAs, teniendo estos últimos, una expresión incrementada o alterada y estadísticamente significativa en las células de cordón umbilical de recién nacidos expuestos al tabaco y PEG. De esta forma se reducirían las dianas más probables y facilitarían un estudio más dirigido. Otras limitaciones a comentar de la investigación son: la imposibilidad de cuantificar la exposición intrauterina al tabaco en la selección de la muestra – que sí se delimita a través del criterio de inclusión de consumo de más de 10 cigarrillos/día – y el propio tamaño muestral. En el trabajo, se evita la limitación habitual de los análisis de metiloma – la variabilidad de patrones de metilación en las células del organismo – al evaluar las variables observadas en el mismo tipo celular y en los dos grupos a estudio.

Los resultados de este trabajo experimental muestran una potencial alteración de rutas moleculares importantes en el CIR, lo que plantea un defecto regulatorio de procesos fundamentales en el crecimiento fetal intrauterino, especialmente a nivel de factores de crecimiento – IGF-1R y EGFR.

Los estudios en esta línea de investigación podrían facilitar en un futuro el desarrollo de aplicaciones clínicas derivadas de los piRNAs. La detección de la desregulación de un piRNA determinado podría ejercer como marcador de exposición intrauterina al tabaco, y por lo tanto, ser útil en el diagnóstico precoz del crecimiento intrauterino restringido y de la susceptibilidad a diversas enfermedades asociadas a su consumo.

6. CONCLUSIONES

- El consumo de tabaco en la gestación modifica los patrones de metilación de DNA en recién nacidos CIR. Estos cambios son especialmente llamativos a nivel de promotores de piRNAs.
- La hipermetilación de los promotores de piRNAs tiene como consecuencia una menor expresión y una disminución de su actividad reguladora.
- En el análisis de los piRNAs cuyos promotores están hipermetilados, se han encontrado genes diana imprescindibles en procesos celulares tales como el ciclo celular, la proliferación y el desarrollo celular.
- En especial, los genes IGFR1 y EFGR, importantes factores de crecimiento a nivel fetal y placentario, participan en el eje molecular del desarrollo intrauterino. La desregulación de estas rutas moleculares debida a la menor expresión de sus piRNAs reguladores podría promover un crecimiento intrauterino inadecuado.
- La detección de la expresión alterada de los piRNAs obtenidos podría servir de marcador precoz de RCIU. El desarrollo de fármacos épigenéticos podría revertir el patrón de metilación aberrante a nivel de los piRNAs y evitar el desarrollo del CIR.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Deichmann U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Dev Biol.* 1 de agosto de 2016; 416 (1):249-54.
2. Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 62:78-89.
3. Reynolds RM, Jacobsen GH, Drake AJ. What is the evidence in humans that DNA methylation changes link events in utero and later life disease? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78(6):814-22.
4. Kim M, Costello J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med.* 2017;49(4):e322.
5. Moyano M, Stefani G. PiRNA involvement in genome stability and human cancer. *J Hematol Oncol.* 2015;8:38.
6. Ding Y xue, Cui H. Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression data provide a regulatory network in intrauterine growth restriction. *Life Sci.* 2017;179:60-5.
7. Hogg K, Price EM, Hanna CW, Robinson WP. Prenatal and perinatal environmental influences on the human fetal and placental epigenome. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(6):716-26.
8. Gordijn SJ, Beune IM, Ganzevoort W. Building consensus and standards in fetal growth restriction studies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;49:117-26.
9. Colella M, Frérot A, Novais ARB, Baud O. Neonatal and Long-Term Consequences of Fetal Growth Restriction. *Curr Pediatr Rev.* 2018;14(4):212-8.

10. Machado Nardoza LM, Junior EA, Barbosa MM, Rabachini Caetano AC, Re Lee DJ, Moron AF. Fetal growth restriction: Current knowledge to the general Obs/Gyn. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286(1):1-13.
11. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995; 311(6998):171.
12. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *Int J Epidemiol.* 2013;42(5):1215-22.
13. Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J Endocrinol.* 2019;242(1):T105-T119.
14. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: A mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res.* 2004;56(3): 311-7.
15. Waterland RA, Michels KB. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. *Annu Rev Nutr.* 2007;27(1):363-88.
16. Krishna RG, Vishnu Bhat B, Bobby Z, Papa D, Badhe B, Kalidoss VK, et al. Identification of differentially methylated candidate genes and their biological significance in IUGR neonates by methylation EPIC array. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;1-9.
17. Radtke KM, Ruf M, Gunter HM, Dohrmann K, Schauer M, Meyer A, et al. Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl Psychiatry.* 2011;1(7):21.
18. Lange S, Probst C, Rehm J, Popova S. National, regional, and global prevalence of smoking during pregnancy in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal.* 2018;6(7):769-76.
19. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General.* Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014.
20. Suter M, Abramovici A, Aagaard-Tillery K. Genetic and epigenetic influences associated with intrauterine growth restriction due to in utero tobacco exposure. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2010;8(2):94-102.
21. Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet.* 2016;98(4):680-696.
22. Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, et al. Tobacco Smoking Leads to Extensive Genome-Wide Changes in DNA Methylation. *PLoS One.* 2013;8(5):e63812.
23. Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J Endocrinol.* 2019;242(1):T105-T119.
24. Iñiguez C, Ballester F, Costa O, et al. Maternal smoking during pregnancy and fetal biometry: the INMA Mother and Child Cohort Study. *Am J Epidemiol.* 2013;178(7):1067-1075.
25. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature.* 2006;442(7099):203-7.
26. Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* 2006;20(13):1709-14.
27. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet.* 2019;20(2):89-108.

28. Hashim A, Rizzo F, Marchese G, Ravo M, Tarallo R, Nassa G, et al. RNA sequencing identifies specific PIWI-interacting small noncoding RNA expression patterns in breast cancer. *Oncotarget*. 2014;5(20):9901-10.
29. Rojas-Ríos P, Simonelig M. piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells. *Development*. 2018;145(17):dev161786.
30. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJG, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, et al. MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Dev Cell*. 2007;12(4):503-14.
31. Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue Y, Hu YP, Zhou Y, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res*. 2014;24(6):680-700
32. Watanabe T, Tomizawa SI, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science*. 2011;332(6031):848-52.
33. O'Donnell KA, Boeke JD. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell*. 2007;129(1):37-44.
34. Goh WS, Falciatori I, Tam OH, et al. piRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. *Genes Dev*. 2015;29(10):1032-1044.
35. Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue Y, Hu YP, Zhou Y, et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res*. 2014;24(6):680-700.
36. Martinez VD, Vucic EA, Thu KL, Hubaux R, Enfield KSS, Pikor LA, et al. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Sci Rep*. 2015;5:10423.
37. Sharma AK, Nelson MC, Brandt JE, Wessman M, Mahmud N, Weller KP, et al. Human CD34+ stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the *Drosophila* gene piwi. *Blood*. 2001;97(2):426-34.
38. Martinez VD, Vucic EA, Thu KL, Hubaux R, Enfield KSS, Pikor LA, et al. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Sci Rep*. 2015;5(1):1-17.
39. Liu Y, Dou M, Song X, et al. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):123.
40. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: Basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol*. 2008;127(3):286-297.
41. Weng W, Liu N, Toiyama Y, Kusunoki M, Nagasaka T, Fujiwara T, et al. Novel evidence for a PIWI-interacting RNA (piRNA) as an oncogenic mediator of disease progression, and a potential prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1).
42. Esposito T, Magliocca S, Formicola D, Gianfrancesco F. PiR_015520 belongs to Piwi-Associated RNAs regulates expression of the human Melatonin receptor 1A gene. *PLoS One*. 2011;6(7).
43. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80). 2015;347(6220):1260419-1260419.
44. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci*. 2019;28(11):1947-1951.
45. Krause BJ, Prieto CP, Muñoz-Urrutia E, San Martín S, Sobrevia L, Casanello P. Role of arginase-2 and eNOS in the differential vascular reactivity and hypoxia-induced endothelial response in umbilical arteries and veins. *Placenta*. 2012;33(5):360-6.

46. Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, et al. piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annu Rev Genet.* 23 de noviembre de 2018;52(1):131-57.

8. ANEXOS

Informe CEICA



Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. P116/0208

14 de septiembre de 2016

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 14/09/2016, Acta Nº 15/2016 ha evaluado la propuesta del Investigador referida al estudio:

Título: Modificaciones epigenéticas inducidas por el tabaco en el crecimiento intrauterino

Investigador Principal: José Ignacio Labarta Aizpún. HU Miguel Servet

Versión protocolo: septiembre/2016

Versión documento de información y consentimiento al participante: septiembre/2016

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el tratamiento de los datos y los documentos para solicitar el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no Interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

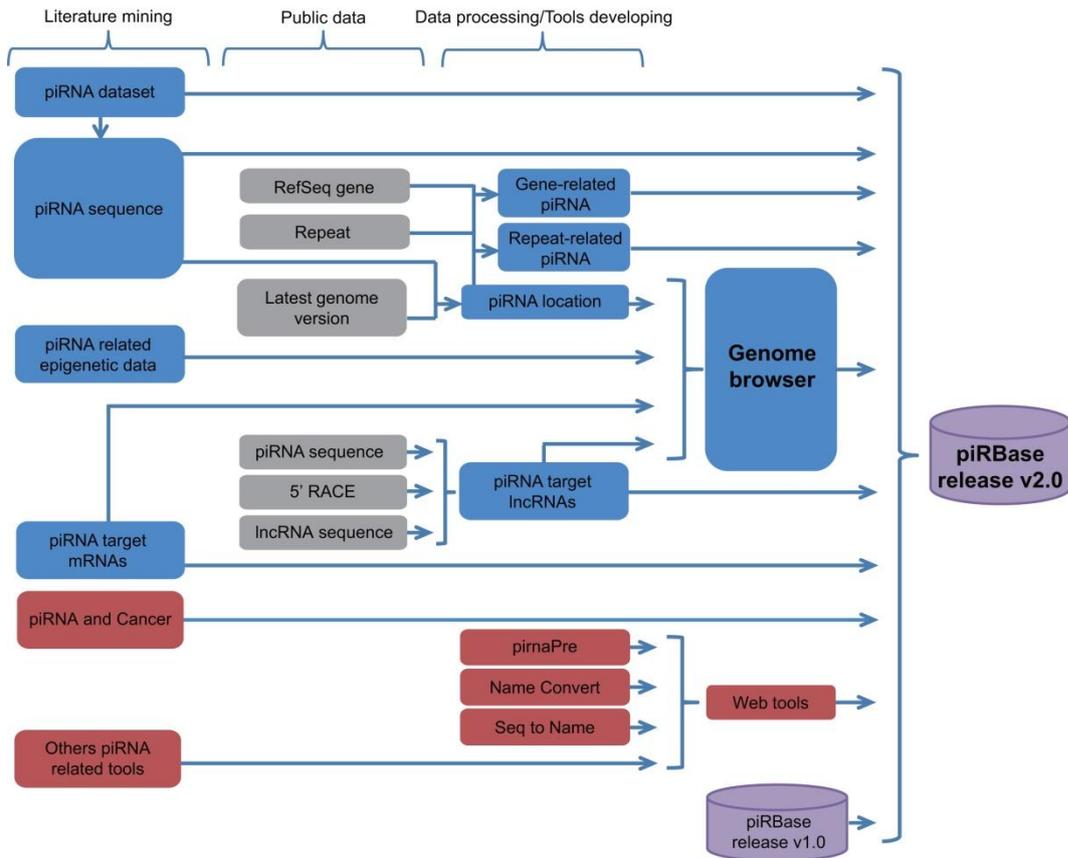
3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 14 de septiembre de 2016

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Anexo 2. Esquema piRBase v2.0

Esquema facilitado en piRBase v2.0 del procesamiento de datos previo al resultado final



Anexo 3. Ejemplo de uso de BLAST.

Ejemplo de filtrado de resultados a través de algoritmo BLAST. Búsqueda de secuencias complementarias del piR-hsa-3315, para la que se añade el gen PGR1 a los resultados de genes asociados por RefSeq que facilita la base de datos piRBase – que únicamente identifica el gen MRFAP1

Standard Nucleotide BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Or, upload file

Job Title

Choose Search Set

Database

Organism

Exclude

Limit to

Entrez Query

Program Selection

Optimize for

Sequences producing significant alignments

Download Manage Columns Show 100

select all 0 sequences selected

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens piRNA piR-41119, complete sequence	60.2	60.2	100%	4e-08	100.00%	DQ573007.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), transcript variant 3, mRNA	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	NM_001272054.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), transcript variant 2, mRNA	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	NM_001272053.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), transcript variant 1, mRNA	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	NM_033296.2
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens cDNA FLJ54153 complete cds, weakly similar to Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), mRNA	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AK300242.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens cDNA FLJ54234 complete cds, moderately similar to Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), mRNA	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AK303874.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens cDNA FLJ41366 fis, clone BRCAN2004173, highly similar to Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), r	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AK123380.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens cDNA FLJ80015 fis, clone HEMBA1000634, highly similar to Homo sapiens Morf4 family associated protein 1 (MRFAP1), r	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AK074498.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens BAC clone RP11-539L10 from 4, complete sequence	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AC093323.3
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens cDNA FLJ26140 fis, clone TMS04780	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AK129651.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens cDNA FLJ25007 fis, clone CBL01018	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AK057736.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens Morf4 family associated protein 1, mRNA (cDNA clone MGC:39081 IMAGE:5434657), complete cds	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	BC022797.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens T-cell activation protein (PGR1) gene, complete cds	58.4	58.4	96%	1e-07	100.00%	AF116272.1

Anexo 4. Ejemplo de alineamiento piRNA-gen asociado

Download GenBank Graphics

Homo sapiens T-cell activation protein (PGR1) gene, complete cds
 Sequence ID: [AF116272.1](#) Length: 2005 Number of Matches: 1

Range 1: 1386 to 1416 GenBank Graphics Next Match Previous Match

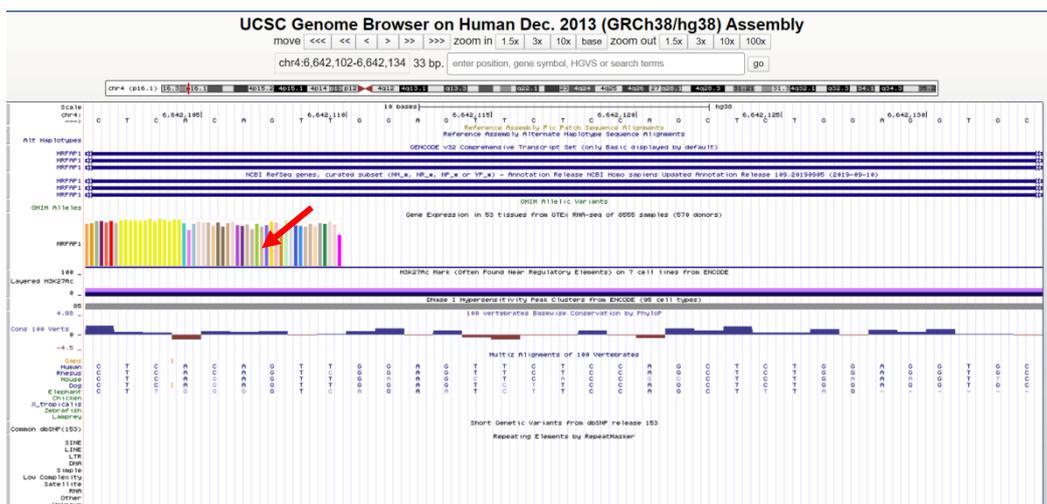
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
58.4 bits(31)	1e-07	31/31(100%)	0/31(0%)	Plus/Plus

```

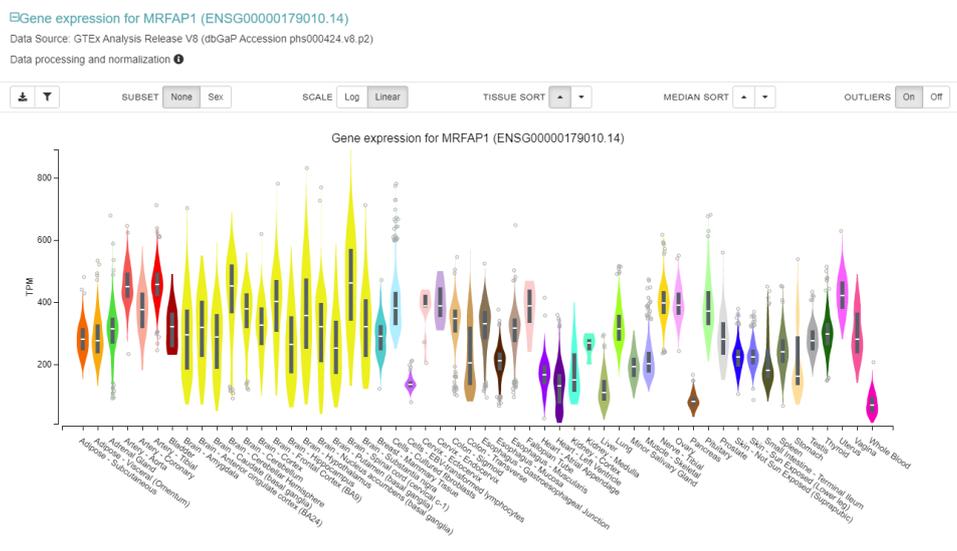
Query 1      TCACAGTTGGAGTTCTCCAGCTCTGGAGGTG 31
Sbjct 1386  TCACAGTTGGAGTTCTCCAGCTCTGGAGGTG 1416
  
```

Anexo 5. Ejemplo de uso de genoma UCSC

Uso del navegador del genoma UCSC. Al introducir el locus del piRNA localiza el gen al que se asocia (en este caso, el ex3 del gen MRFAP1). La flecha roja indica la expresión génica del gen MRFAP1, y dirige a la web de GTEx.



Visualización del portal GTEx, que facilita información en torno a la expresión tisular del gen a estudio.



Anexo 6. Resultados de mRNA diana

Tabla. mRNA 3'UTR diana de piR-hsa-7096.

TCGGCATCAATATGGTGACCTCCCGGG. 28 resultados.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	94	submission	ACVR1	activin A receptor type 1
Details	2	88	submission	GREB1	growth regulating estrogen receptor binding 1
Details	3	88	submission	C7orf26	chromosome 7 open reading frame 26
Details	4	88	submission	ATP6V0A2	ATPase H+ transporting V0 subunit a2
Details	5	87	submission	PRR29	proline rich 29
Details	6	86	submission	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2
Details	7	82	submission	CDCP1	CUB domain containing protein 1
Details	8	79	submission	SOX2	SRY-box 2
Details	9	78	submission	NCAPG2	non-SMC condensin II complex subunit G2
Details	10	76	submission	ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca2+ transporting 1
Details	11	75	submission	RASAL2	RAS protein activator like 2
Details	12	69	submission	PML	promyelocytic leukemia
Details	13	69	submission	GOSR1	golgi SNAP receptor complex member 1
Details	14	68	submission	ADGRL3	adhesion G protein-coupled receptor L3
Details	15	66	submission	SLC2A1	solute carrier family 2 member 1
Details	16	65	submission	C22orf24	chromosome 22 open reading frame 24
Details	17	63	submission	BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1
Details	18	62	submission	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1
Details	19	61	submission	NKD1	NKD1, WNT signaling pathway inhibitor
Details	20	59	submission	PPP1R7	protein phosphatase 1 regulatory subunit 7
Details	21	59	submission	TBC1D15	TBC1 domain family member 15
Details	22	59	submission	MAU2	MAU2 sister chromatid cohesion factor
Details	23	56	submission	NCALD	neurocalcin delta
Details	24	54	submission	ARSD	arylsulfatase D
Details	25	54	submission	GCSAM	germinal center associated signaling and motility
Details	26	53	submission	CTDSP2	CTD small phosphatase 2
Details	27	51	submission	MCC	MCC, WNT signaling pathway regulator
Details	28	50	submission	INCA1	inhibitor of CDK, cyclin A1 interacting protein 1

Tabla. Región 3'UTR mRNA diana de piR-hsa-32221

TAGTGGCTATGCCGATCGGGTGTC. 22 resultados.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	90	submission	COL4A3BP	collagen type IV alpha 3 binding protein
Details	2	88	submission	NR3C1	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
Details	3	80	submission	FAM3C	family with sequence similarity 3 member C
Details	4	80	submission	SF3B3	splicing factor 3b subunit 3
Details	5	71	submission	RASA2	RAS p21 protein activator 2
Details	6	70	submission	NHLH1	nescient helix-loop-helix 1
Details	7	70	submission	RHD	Rh blood group D antigen
Details	8	70	submission	SLC10A4	solute carrier family 10 member 4
Details	9	68	submission	PRKACB	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta
Details	10	68	submission	TEAD1	TEA domain transcription factor 1
Details	11	64	submission	ATXN1L	ataxin 1 like
Details	12	62	submission	PCDH11X	protocadherin 11 X-linked
Details	13	61	submission	RBSN	rabenosyn, RAB effector
Details	14	57	submission	C17orf58	chromosome 17 open reading frame 58
Details	15	57	submission	ADAMTSL1	ADAMTS like 1
Details	16	57	submission	PRPF38B	pre-mRNA processing factor 38B
Details	17	57	submission	CIDEC	cell death inducing DFFA like effector c
Details	18	55	submission	CUX1	cut like homeobox 1
Details	19	55	submission	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2
Details	20	51	submission	F3	coagulation factor III, tissue factor
Details	21	50	submission	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4 group A member 1
Details	22	50	submission	PRKCE	protein kinase C epsilon

Tabla. Región 3'UTR mRNA diana de piR-hsa-17047

TGGAATGGTGACAACATGCTGGAGCC.

810 resultados. 2 de ellos con score máximo (genes MMD y XPO6)

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	100	submission	MMD	monocyte to macrophage differentiation associated
Details	2	100	submission	XPO6	exportin 6
Details	3	98	submission	SS18	SS18, nBAF chromatin remodeling complex subunit
Details	4	98	submission	PIK3C2A	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha
Details	5	98	submission	SERP1	stress associated endoplasmic reticulum protein 1
Details	6	98	submission	ZFP36L2	ZFP36 ring finger protein like 2
Details	7	98	submission	GJA1	gap junction protein alpha 1
Details	8	97	submission	GLCC1	glucocorticoid induced 1
Details	9	97	submission	BOLL	boule homolog, RNA binding protein
Details	10	97	submission	CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A
Details	11	96	submission	TNKS2	tankyrase 2
Details	12	96	submission	FAM102A	family with sequence similarity 102 member A
Details	13	96	submission	KAT6A	lysine acetyltransferase 6A
Details	14	96	submission	PDCD4	programmed cell death 4
Details	15	96	submission	YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta
Details	16	96	submission	DLG1	discs large MAGUK scaffold protein 1
Details	17	96	submission	NFAT5	nuclear factor of activated T cells 5
Details	18	96	submission	MED26	mediator complex subunit 26
Details	19	96	submission	SLC39A10	solute carrier family 39 member 10
Details	20	96	submission	NSE	N-ethylmaleimide sensitive factor, vesicle fusing ATPase
Details	21	95	submission	SMIM14	small integral membrane protein 14
Details	22	95	submission	DLG2	discs large MAGUK scaffold protein 2
Details	23	95	submission	NFATC3	nuclear factor of activated T cells 3
Details	24	95	submission	TEX2	testis expressed 2
Details	25	95	submission	STMN2	stathmin 2
Details	26	95	submission	ZNF281	zinc finger protein 281
Details	27	94	submission	PLAGL2	PLAG1 like zinc finger 2
Details	28	94	submission	MAX	MYC associated factor X
Details	29	94	submission	PSMA7	proteasome subunit alpha 7

Tabla. Región 3'UTR mRNA diana de piR-hsa-10802

TGAGCAGATGCTTAACGTGCAGAACA

710 hits

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	98	submission	RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
Details	2	98	submission	KANK4	KN motif and ankyrin repeat domains 4
Details	3	97	submission	TNRC6B	trinucleotide repeat containing 6B
Details	4	97	submission	GNAI3	G protein subunit alpha i3
Details	5	97	submission	ADH1A	alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide
Details	6	96	submission	ATAD2B	ATPase family, AAA domain containing 2B
Details	7	96	submission	ADAM22	ADAM metalloproteinase domain 22
Details	8	96	submission	IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor
Details	9	96	submission	ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family member A1
Details	10	96	submission	AKIRIN1	akirin 1
Details	11	96	submission	ATG14	autophagy related 14
Details	12	95	submission	CDK19	cyclin dependent kinase 19
Details	13	94	submission	SERTAD2	SERTA domain containing 2
Details	14	94	submission	DHX36	DEAH-box helicase 36
Details	15	94	submission	FKBP1B	FKBP prolyl isomerase 1B
Details	16	94	submission	OSER1	oxidative stress responsive serine rich 1
Details	17	94	submission	PPTC7	PTC7 protein phosphatase homolog
Details	18	94	submission	BSDC1	BSD domain containing 1
Details	19	94	submission	CLSTN2	calsyntenin 2
Details	20	94	submission	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type R
Details	21	93	submission	TNFAIP1	TNF alpha induced protein 1
Details	22	93	submission	FKBP5	FKBP prolyl isomerase 5
Details	23	93	submission	BEND2	BEN domain containing 2
Details	24	92	submission	UUY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked
Details	25	92	submission	PGAP1	post-GPI attachment to proteins 1

Tabla. Región 3'UTR mRNA diana de piR-hsa-1657

AGGGCGGTGCAAGATGTGCTTTGTTAAAC

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	92	submission	SCLY	selenocysteine lyase
Details	2	88	submission	TGS1	trimethylguanosine synthase 1
Details	3	84	submission	CYBC1	cytochrome b-245 chaperone 1
Details	4	83	submission	KLC2	kinesin light chain 2
Details	5	81	submission	SZRD1	SUZ RNA binding domain containing 1
Details	6	81	submission	DERA	deoxyribose-phosphate aldolase
Details	7	75	submission	TAF1L	TATA-box binding protein associated factor 1 like
Details	8	72	submission	ZFHX3	zinc finger homeobox 3
Details	9	71	submission	CPLX1	complexin 1
Details	10	67	submission	APC2	APC2, WNT signaling pathway regulator
Details	11	64	submission	BEND7	BEN domain containing 7
Details	12	63	submission	NRARP	NOTCH regulated ankyrin repeat protein
Details	13	62	submission	U2AF1L4	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4
Details	14	62	submission	VRK3	VRK serine/threonine kinase 3
Details	15	62	submission	PRDM13	PR/SET domain 13
Details	16	61	submission	PLEK	pleckstrin
Details	17	60	submission	HPD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
Details	18	58	submission	WDR4	WD repeat domain 4
Details	19	58	submission	PAX8	paired box 8
Details	20	57	submission	CYGB	cytoglobin
Details	21	57	submission	TAF1	TATA-box binding protein associated factor 1
Details	22	57	submission	SDC3	syndecan 3
Details	23	57	submission	GRIN1	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1
Details	24	56	submission	DUSP22	dual specificity phosphatase 22
Details	25	55	submission	FYN	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
Details	26	54	submission	SLC25A35	solute carrier family 25 member 35
Details	27	54	submission	MAGIX	MAGI family member, X-linked
Details	28	54	submission	RASL10B	RAS like family 10 member B
Details	29	53	submission	DCANP1	dendritic cell associated nuclear protein
Details	30	53	submission	SEC16A	SEC16 homolog A, endoplasmic reticulum export factor
Details	31	51	submission	ZBTB22	zinc finger and BTB domain containing 22
Details	32	51	submission	SETPB	surfactant protein B
Details	33	50	submission	OPN1LW	opsin 1, long wave sensitive
Details	34	50	submission	OPN1MW2	opsin 1, medium wave sensitive 2