

COMPLEJIDAD Y CONSTRUCCIÓN DE UNA RED DE GENES ASOCIADOS A PREECLAMPSIA.

COMPLEXITY AND CONSTRUCTION OF A NETWORK OF GENES ASSOCIATED PREECLAMPSIA

Alejandra Rodríguez¹, José María Satizábal¹, Adalberto Sánchez¹, Julio Montoya^{1,2}, Felipe García Vallejo¹

¹Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de ciencias fisiológicas. Escuela de ciencias básicas. Facultad de salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia.

²Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Occidente. Cali. Colombia

Recibido: Septiembre 30 de 2014

Aceptado: Octubre 10 de 2014

*Correspondencia del autor: Escuela de ciencias básicas. Facultad de salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia

RESUMEN

Propósitos del estudio: La Preeclampsia es un desorden multisistémico estudiado ampliamente por ser la principal causa de mortalidad materna tanto en Colombia como en el mundo. Investigaciones previas han mostrado la asociación de ciertos genes con esta enfermedad, e incluso se han encontrado patrones de metilación diferencial en algunos de estos y en secuencias repetidas que los rodean. El propósito de este estudio fue cuantificar la interacción de genes asociados a partir de datos de experimentos de micromatrices de ADN en placentas preeclámpsicas. **Procedimientos básicos:** Usando el programa Cytoscape 3.1, se construyó una red de expresión génica, utilizando valores de z score obtenidos de una micromatriz de expresión de genes depositada en la base de datos "Gene Expression Omnibus". Además, se caracterizó la cromatina asociada a estos genes, realizando un paseo cromosómico en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen, empleando recursos del *Genome Browser* y de la base de datos *National Center of Biotechnology Information*. **Principales hallazgos:** Se encontró una predominancia de las secuencias Alu, MIR, SINE y LINE, sin embargo no se encontraron diferencias significativas al comparar las regiones upstream y downstream asociadas a cada gen. La red mostró a los genes EBI3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 y KRT19, como expresados altamente en placenta preeclámpsica. **Principales conclusiones:** Las categorías ontológicas de la red corroboraron la asociación de estos genes con la Preeclampsia. Se puede inferir que la expresión diferencial de genes expresados en placenta preeclámpsica, se convierte en un criterio de discriminación diagnóstica de la patología.

Palabras claves: Preeclampsia, Bioinformática, Micromatrices de ADN, Red de Expresión Génica, secuencias repetidas.

ABSTRACT

Purpose of the study: Preeclampsia is a multisystem disorder extensively studied for being the leading cause of maternal mortality in Colombia and the world. Previous research has shown the association of certain genes in this disease, and even found differential methylation patterns in some of these repeated sequences and those around them. The purpose of this study was to quantify the interaction of genes associated data from DNA microarray experiments in preeclamptic placentas. **Basic procedures:** Using 3.1 Cytoscape program, a network of gene expression was constructed using z score values obtained from a microarray gene expression deposited in the database “Gene Expression Omnibus”. Additionally, the chromatin associated with these genes was characterized in carrying out a chromosome walk 100Kpb windows around each gene, using resources and Genome Browser Database National Center for Biotechnology Information. **Main findings:** a predominance of Alu, MIR, SINE and LINE sequences were found; however, no significant differences were found when comparing the upstream and downstream regions associated with each gene. The network showed the Ebi3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 and KRT19 genes, as highly expressed in preeclamptic placenta. **Conclusions:** The network ontological categories corroborated the association of these genes with preeclampsia. It can be inferred that differential expression of genes expressed in preeclamptic placenta becomes discriminatory diagnostic criteria of pathology.

Keywords: Preeclampsia, bioinformatics, Microarrays of ADN, Gene Expression Network, repeated sequences.

INTRODUCCIÓN

La Preeclampsia (PE) es una enfermedad hipertensiva específica del embarazo y es una de las principales causas de morbimortalidad materna y neonatal en todo el mundo, afectando del 5 al 7% de todos los embarazos (1). En Colombia es la primera causa de morbilidad y mortalidad materna, siendo un problema de salud pública (2). Esta enfermedad es caracterizada por presión arterial mayor de 140/90 mmHg y proteinuria mayor de 0,3 g/l (1,3) después de las 20 semanas de gestación (2,4). Se ha indicado que este trastorno se origina en la placenta, debido a que la sintomatología desaparece una vez ésta se extrae, además, también se han reportado casos de Preeclampsia en mujeres con embarazos molares, es decir, con desarrollo de placenta mas no del feto (5). Involucra una invasión inadecuada del citotrofoblasto (6), disfunción endotelial materna y expresión alterada de factores angiogénicos y anti-angiogénicos (7,8). Debido a esto se han realizado diversos estudios, entre los cuales se encuentra el de Tejera y colaboradores (9), en el que se realizaron redes de co-expresión de genes previamente relacionados con esta enfermedad, y se utilizó un nuevo algoritmo con el fin de priorizar algunos genes asociados en PE.

El uso de microarreglos para estos estudios se ha extendido ampliamente, ya que permite una investigación exhaustiva de los posibles cambios en la expresión de genes asociados con la patofisiología de la Preeclampsia a nivel transcripcional (10). Por otro lado, investigaciones han dilucidado el papel esencial de la placenta en el desarrollo de la Preeclampsia, puesto que al ser extraída de una mujer con esta enfermedad, los síntomas desaparecen por completo (11); es por esto que una gran cantidad de estudios han optado por analizar la expresión de genes en este tejido y han logrado priorizar algunos genes como biomarcadores de esta enfermedad (12). En este contexto se han realizado numerosos trabajos, uno de los más recientes y del que se obtuvieron los datos para este estudio es el de Xiang y colaboradores (4), en el que se compararon los perfiles de expresión genética tanto en placentas normales como en preeclámpticas mediante el uso de un microarreglo. Otro avance reciente que se ha reportado es el realizado por Schroeder y colaboradores (13), en el que se han revelado aspectos del metiloma de la placenta humana. Por otro lado, también han surgido numerosos artículos que utilizan la bioinformática como herramienta para analizar datos obtenidos de microarreglos (14,16), obteniendo resultados realmente válidos, asequibles y que

aportan al conocimiento que hasta ahora se tiene de la PE.

Las redes de expresión permiten visualizar no solo la expresión de diferentes genes, sino también realizar un análisis más completo, teniendo en cuenta las interacciones proteicas de éstos. Es por esto que el presente estudio tuvo como propósito la identificación y análisis de genes expresados en placenta preecláptica, mediante la construcción de una red de expresión genética. También se tuvo como objetivo la caracterización de la cromatina asociada tanto codificante como no codificante de los genes asociados con Preeclampsia, con el fin de extraer información que ayude a dilucidar la etiología molecular de la Preeclampsia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión de literatura

Para este estudio se analizaron 28 genes asociados con Preeclampsia, 16 de ellos -BCL6, CA10, COL17A1, EIB3, ENG, FLT1, FSTL3, HEXB, INHA, INHBA, LEP, PHYHIP, PROCR, SASH1, SLC6A8, ST5- extraídos del trabajo de Ceballos (2011), en el cuál se realizó un meta-análisis consultando en la base de datos de PubMed del National Center for Biotechnology Information NCBI, artículos científicos donde se reportaran perfiles de expresión (con micromatrices) de genes con asociación significativa a Preeclampsia. Además de estos, para este estudio de adicionaron otros 12 genes -NDRG1, SPAG4, JAG1, TREM1, HTRA4, CRH, HTRA1, PVRL4, KRT19, SLCO2A1, RDH13 y SH3PXD2A- que fueron consultados en el presente año 2014 en varios artículos científicos recientes, donde también se reportaba su expresión diferencial en placentas preeclápticas con un *fold change* mayor a 1,5.

Minería de datos

Se colectó información característica de cada gen, como su número de exones totales y codificantes, tamaño total en pares de bases, número de islas CpG, y ubicación en cromosoma, en el Genome Browser de la UCSC. Además, se realizó un paseo cromosómico en ventanas de 10Kpb rodeando cada gen hasta completar 100Kpb tanto upstream como downstream. Se extrajeron datos del número de secuencias repetidas y genes presentes en cada región utilizando el Map Viewer del NCBI. Toda esta información fue organizada en tablas dinámi-

cas y gráficas en Microsoft™ Excel 2010 para su posterior análisis. Los valores de expresión utilizados para la posterior construcción de la red de expresión, se extrajeron de la base de datos Gene Expression Omnibus GEO, específicamente del estudio realizado por Xiang y colaboradores (2013), donde se utilizó un microarreglo NimbleGen Homo sapiens HG18 (GSE43942), para obtener perfiles de expresión de genes de placentas preeclápticas

Construcción de la red

Para la construcción de la red de expresión génica, se utilizó el programa Cytoscape 3.1 (18). En primer lugar, se construyó una matriz de datos base, en la cual se organizaron datos de interacción de cada uno de los genes a evaluar; estas interacciones fueron colectadas de las bases de datos PINA2, BioGRID, GeneMANÍA y STRING 9.1. Posteriormente, a la red formada con estas interacciones, se le adicionaron los valores de expresión para placenta preecláptica. Los datos introducidos a este programa no fueron los valores de intensidad reportados en el estudio del que se extrajeron, sino su conversión en niveles de expresión con el índice z-score con base en la siguiente ecuación.

$$Z \text{ Score} = \frac{\text{Intensidad de expresión del gen en el órgano} - \text{Intensidad promedio en todos los órganos listados}}{\text{Desviación estándar en todos los órganos listados}}$$

La Información sobre la ontología del gen –categorías GO- de procesos biológicos estadísticamente destacados para los genes asociados fue extraída de la red utilizando el plugin BinGO.

Análisis estadístico

Para analizar las secuencias repetidas, realizó un paseo cromosómico, sumando el número de integrantes registrados correspondientes a las secuencias SINE, LINE Alu y MIR en 100Kpb a los lados de cada gen asociado, en intervalos de 10Kpb. Estos datos de la cromatina asociada no codificante upstream y downstream de cada gen, fueron comparados con una prueba t-student utilizando el programa Statistica 8.0 (19). Estos datos también fueron graficados en un diagrama de barras en el software Microsoft™ Excel 2010. También se realizó un diagrama de barras con el número de interacciones encontradas para cada gen asociado.

RESULTADOS

Caracterización de cromatina

En cuanto a la cromatina no codificante asociada a los genes evaluados, se encontró dominancia a ambos lados de cada gen de las secuencias SINE, LINE, Alu y MIR, si embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el número de éstas al comparar las zonas 100Kpb upstream y downstream (figura 1). Esto se confirmó con una prueba t-student ($p > 0,01$). La caracterización de todos los genes evaluados se encuentra en la tabla 1, donde se muestran variables de la cromatina asociada, como lo son el número de islas CpG, exones y genes presentes, también para cada gen en zonas a su alrededor de 100Kpb.

Red de expresión génica

La red de expresión realizada para placenta preecláptica se presenta en la figura 2. En esta se muestra que los genes destacados por su alta expresión fueron EBI3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 y KRT19. También, entre los genes con menor expresión se destacó BCL6 y LEP. La estructura de la red definió dos nodos principales, con el mayor número de interacciones, el más grande de ellos formado alrededor del gen BCL6 y el segundo, formado alrededor de NDRG1. La topología de la red (tabla 2) indicó 531 nodos con un promedio de interacción proteína-proteína de 2,049. En la figura 3 se presenta un diagrama de barras que muestra de una forma más clara, el número de interacciones que presentó cada gen asociado, siendo, como se mencionó anteriormente, el de mayor interacciones BCL6, seguido por NDRG1 y KRT19, y dejando de último a genes como HTRA4 y SLCO2A1.

Las categorías GO para procesos biológicos de los genes asociados se presentan en la tabla 3. Se muestran las primeras 15 categorías ontológicas con su respectivo ID y p-value, éstas corresponden a los procesos biológicos estadísticamente más representativos de la red. Se destacaron procesos como la regulación negativa del proceso apoptótico, vascularización, el modelado de vasos sanguíneos y el brote de angiogénesis, entre otros, los cuales han sido ampliamente relacionados con la patogénesis de la Preeclampsia.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la cromatina asociada a los genes evaluados, aunque no presentaron diferencias significativas en las regiones upstream y downstream, indican la presencia de diversas secuencias repetidas, entre ellas, las que se encontraron en mayor cantidad, LINE, Alu, MIR y SINE. Es importante tener en cuenta estos elementos repetidos, puesto que recientemente se ha demostrado la importancia de la cromatina no codificante (20) en la funcionalidad del genoma. Un ejemplo de esto es la hipermetilación diferencial en elementos repetidos del ADN -como lo son las secuencias LINE-, que ha sido reportada en molas parcialmente hidatiformes, a su vez también relacionadas con Preeclampsia (21); con esto se podría pensar que la expresión diferencial de ciertos genes en placentas preeclámpticas puede deberse, aunque sea en parte, a las diferencias en metilación de éstas secuencias, y no solo de las islas CpG que han sido mucho más estudiadas.

Los genes EBI3, ENG, PVRL4, TGFB1, INHBA, FSTL3, HTRA1 y KRT19 fueron los más expresados según la red construida para placenta preecláptica, éstos han sido ampliamente reportados en la literatura por su relación con PE (22,24). El gen ENG codifica para la endogлина, el cual es un co-receptor del factor transformante de crecimiento $\beta 1$ y $\beta 3$ sobre membranas de células del endotelio y sincitiotrofoblásticas. Ésta es altamente incrementada en el suero materno de mujeres con PE y puede actuar en conjunto con sFLT1 e inducir a PE severa (25). Por otro lado, puede reducir la señalización endotelial del óxido nítrico al inhibir TGF- $\beta 1$, causando la disfunción endotelial característica de esta enfermedad (25).

La respuesta inmune es uno de los temas que más relevancia ha tenido en el estudio de la PE, debido a que durante la placentación, las células natural killer (NK), linfocitos del sistema inmune innato, producen una parte importante de la respuesta inflamatoria decidual, éstas facilitan la placentación al secretar citoquinas que promueven la infiltración de las arterias espirales por el trofoblasto invasor (26). Por lo tanto se ha concluido que una falla en esta respuesta inmune, conllevaría al desarrollo de la PE. Uno de los genes relacionados con esta respuesta es EBI3, Epstein-Barr virus Induced gene

3, éste se expresa altamente en células placentarias, incluyendo sincitiotrofoblastos y trofoblastos extravelllosos, además de ser regulado positivamente en la circulación de mujeres embarazadas (27). Esta información junto con el descubrimiento de que el péptido EBI3 es presentado por HLA-G, ha sugerido que este gen es un modulador inmune crucial en la relación materno-fetal (25,24). Su expresión diferencial mostrada en las redes construidas y previamente coincide con la literatura, y muestra que existe una fuerte reacción inmune como respuesta a un cambio que el cuerpo de la madre reconoce como negativo, sin embargo no se conoce exactamente qué causa este incremento ni su relación exacta con la PE.

Los genes PVRL4 y KRT19 por su parte, no han sido ampliamente relacionados con esta enfermedad, sin embargo, en recientes estudios se han reportado como altamente expresados en placentas preeclámpticas (28,29). PVRL4 codifica para la proteína receptora asociada al poliovirus 4, y su forma secretada, ha sido encontrada en pacientes con cáncer de mama. En este punto, es importante resaltar lo que menciona Louwen y colaboradores (25), esto es, que el desarrollo de tumores, y el embarazo comparten muchas características, como lo son la inmunotolerancia y la invasión. Así, cuando se presentan desregulaciones en el proceso normal del embarazo, se conlleva a la Preeclampsia. En este contexto, se podría pensar que efectivamente, una falla en la regulación del gen PVRL4 aportaría al desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado, el gen KRT19, que codifica para una proteína de función estructural, sin embargo, según una de las categorías ontológicas en las que está involucrada es la diferenciación celular involucrada en el desarrollo de la placenta embriónica. La desregulación de este gen entonces, podría llevar a pensar en un mal funcionamiento de este proceso y su relación con el desarrollo de la Preeclampsia. Sin embargo, se necesitan posteriores estudios para encontrar más evidencias de la relación de estos dos genes con esta enfermedad.

Los genes INHBA, FSTL3 y HTRA1 también han sido reportados previamente expresados diferencialmente en placentas preeclámpticas. El primero, codifica para la proteína inhibina beta A, y hace parte de la vía de señalización del factor transformante de crecimiento beta $-TGF\beta-$, el cual a su vez está involucrado en la regulación del desarrollo vascular y la angiogénesis, incluyendo el brote de angiogénesis (30). Esta proteína también

está relacionada con el desarrollo de diversos tipos de tumores (31,32), por lo que su estudio de asociación con Preeclampsia debería ser profundizado. El gen FSTL3, que codifica para la glicoproteína secretada follistatin like-3, al igual que INHBA, también participa en la vía de señalización del factor transformante de crecimiento beta $-TGF\beta-$, y ha sido ampliamente reportado como expresado en placenta preeclámptica (33). Por último, el gen HTRA1 que codifica para la proteína high temperature requirement A 1, está involucrada en la invasión y migración del trofoblasto, y además ha sido relacionado con Preeclampsia por su alta expresión en pacientes con la enfermedad (34,36). Es importante aclarar, de la red construida, que la baja expresión de genes como BCL6, LEP y FLT1, que han sido reportados en diversos estudios por su expresión en placenta preeclámptica (37,25,38), no implica que no estén asociados con Preeclampsia, sino que en comparación con los otros genes, estos tuvieron un menor valor de intensidad.

Las categorías GO de procesos biológicos extraídas de la red, mostraron el dominio de procesos como la modelación de vasos sanguíneos, regulación negativa de la vía de señalización del receptor del $TGF\beta 1$, brote de angiogénesis y regulación negativa de la cascada de JNK, los cuales tienen relación con la placentación, y proceso de desarrollo del embarazo. Esto corrobora que aún pequeñas alteraciones en genes relacionados con estos procesos, puede desencadenar una mala función y los posteriores síntomas ampliamente conocidos de PE. En este estudio se confirmó la alta expresión en placenta preeclámptica de genes ampliamente relacionados con esta enfermedad, como lo son ENG, FSTL3 y EBI3 entre otros, por medio de la construcción de una red de expresión. En cuanto a la caracterización de la cromatina asociada no codificante de los genes evaluados, aunque no hayan presentado diferencias significativas en las regiones upstream y downstream, es importante tenerla en cuenta y en futuros estudios analizar su estado de metilación, quizá comparando placentas normales y preeclámpticas, ya que podría hallarse información importante acerca del porqué de la alta o baja expresión de ciertos genes. También es importante continuar con este tipo de trabajos, de carácter bioinformático, puesto que con ellos se puede extraer mucha más información de los estudios realizados en laboratorio y así no dejar por fuera detalles que podrían ser de ayuda al conocimiento de una enfermedad tan grave y mortal como lo es la Preeclampsia.

FIGURAS Y TABLAS

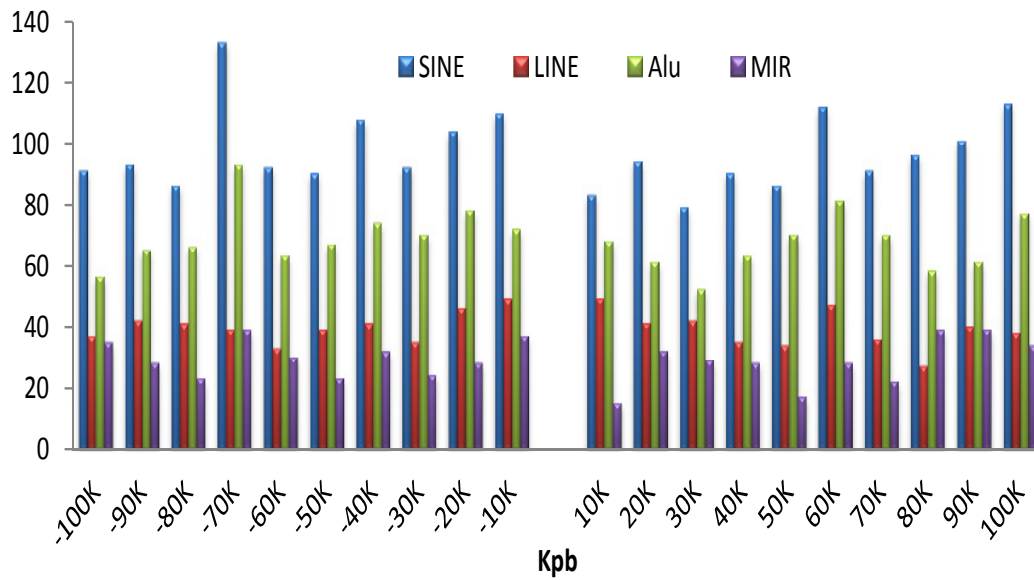


Figura 1. Distribución de elementos repetidos obtenida del paseo cromosómico de 100Kpb alrededor de genes asociados con Preeclampsia, se resaltan las secuencias repetidas SINE, LINE, Alu y MIR.

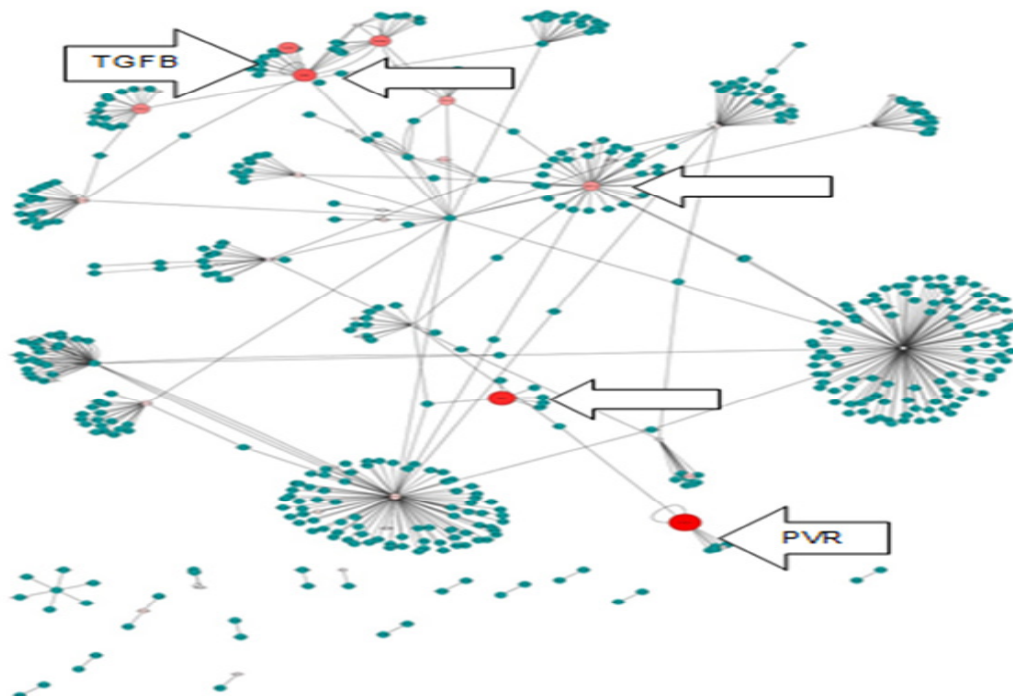


Figura 2. Red de expresión para placenta preecláptica obtenida mediante la aplicación del programa Cytoscape 3.1. Los círculos más grandes y de color rojo resaltan los genes de mayor expresión.

Tabla 1. Caracterización de genes asociados en ventanas de 100Kpb alrededor de cada gen.

Gen	Locus	No. Exo- nes	No. exones codifican- tes	No. Genes región 100-	No. Genes región 100+	No. Rep. región 100-	No. Rep. región 100+	Islas CpG región100-	Islas CpG re- gión100+
NDRG1	8q 24.22	16	15	15	0	170	173	0	149
SPAG4	20q 11.22	12	12	12	2	191	209	194	138
JAG1	20p 12.2	26	26	26	2	132	134	0	255
TREM1	6p 21.1	4	4	4	6	147	154	0	241
HTRA4	8p 11.22	9	9	9	1	185	201	77	152
CRH	8q13.1	2	1	1	3	205	173	50	0
HTRA1	10q 26.13	9	9	9	0	147	182	301	0
PVRL4	1q 23.3	9	9	9	5	257	202	88	313
KRT19	17q 21.2	6	6	6	6	151	173	0	104
SLCO2A1	22.1 - 3q 22.2	14	14	14	2	188	115	172	93
RDH13	19q 13.42	7	7	7	6	224	196	130	657
SH3PXD2A	10q 24.33	14	14	14	1	153	154	286	110
BCL6	3q27.3	10	8	8	1	142	144	49	0
CA10	17q21.33- q22	10	9	9	2	199	217	72	61
COL17A1	10q24.33 - 10q25.1	56	55	55	0	130	125	200	244
EBI3	19p13.3	5	5	5	3	297	271	578	482
ENG	9q34.11	15	15	15	1	271	193	0	301
FLT1	13q12.2 - 13q12.3	30	30	30	1	145	133	1908	514
FSTL3	19p13.3	5	5	5	6	159	241	160	56
HEXB	5q13.3	14	14	14	1	129	138	971	125
INHA	2q35	2	2	2	0	111	158	0	26
INHBA	7p14.1	3	2	2	2	140	143	272	255
LEP	7q32.1	3	2	2	2	132	103	131	53
PHYHIP	8p21.3	5	4	4	4	158	140	0	44
PROCR	20q11.2 2	4	4	4	7	231	232	593	476
SASH1	6q24.3	20	20	20	2	149	165	0	44
SLC6A8	Xq28	13	13	13	2	148	135	593	476
ST5	11p15.4	20	19	19	5	140	146	158	285

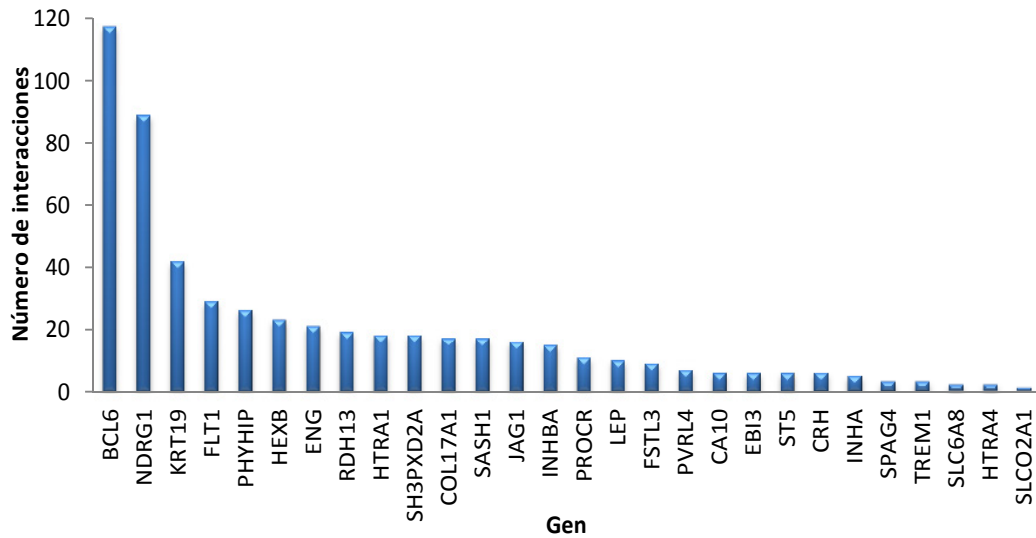


Figura 3. Número de interacciones de tipo proteico encontradas para cada gen asociado a pre-eclampsia en la red construida.

Tabla 3. Categorías GO para procesos biológicos de genes asociados, dadas por la herramienta BiNGO del programa Cytoscape.

GO-ID	Descripción	p-value
0048519	Regulación negativa del proceso apoptótico	2,5332E-39
0048523	Regulación negativa de la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento transformante beta	1,9388E-37
0048518	Regulación positiva de la fagocitosis	6,7524E-37
0048522	Regulación positiva de la división celular	1,2989E-35
0048513	Desarrollo de órganos	1,7822E-30
0050793	Regulación de la diferenciación celular	4,7293E-30
0048856	Brote de angiogénesis	4,5991E-28
0048731	Modelado de vasos sanguíneos	1,0080E-27
0009892	Regulación negativa de la cascada de JNK	4,1256E-27
0050789	Regulación negativa de la señalización TOR	1,6664E-26
0031324	Regulación negativa del proceso biosintético de la interleucina-6	2,3670E-26
0010604	Regulación positiva de la autofosforilación de proteínas	4,8049E-26
0010605	Regulación negativa de la actividad quinasa JUN	9,7457E-26
0032502	Vasculogénesis	1,0442E-25
0030154	Proceso apoptótico involucrado en la morfogénesis	2,8501E-25

Tabla 2. Datos topológicos de la red construida en el programa Cytoscape.

Medidas topológicas	Valor
Coefficiente de agrupamiento	0,013
Componentes conectados	16
Diámetro de la red	8
Radio de la red	1
Centralización de la red	0,216
Trayectorias más cortas	243620 (86%)
Longitud de trayectoria característica	4,027
Número promedio de vecinos	2,049
Número de nodos	531
Densidad de la red	0,004
Heterogeneidad de la red	3,463
Nodos aislados	0
Número de auto-bucles	7
Par de nodos multi-borde	35

BIBLIOGRAFÍA

1. Ajayi, F., Kongoasa, N., Gaffey, T., Asmann, Y.W., Watson, W.J., Baldi, A., Lala, P., Shrinidhar, V., Brost, B. & Chien, J. (2008), "Elevated expression of serine protease Htra1 in Preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, Vol. 199 No. 5, pp. 557e1-557e10
2. Arenas, D. & Mesa, C. (2008), "Genética de la preeclampsia", *Revista CES medicina*, Vol. 22 No.2, pp. 57-67.
3. Bell, M.J., BSN, R.N. & Conley, Y.P. (2013), "A systematic review of endoglin gene expression in Preeclampsia", *Biological Research for Nursing*, Vol. 15 No. 2, pp. 129-136.
4. Bhan, A., Galas, D.J. & Dewey, T.G. (2002), "A duplication growth model of gene expression networks", *Bioinformatics*, Vol. 18 No. 11, pp. 1486-1493.
5. Ceballos, V. (2011), "Análisis y caracterización genómica y funcional de genes asociados a preeclampsia", Universidad del Valle.
6. Centlow, M., Wingren, C., Borrebaeck, C. Brownstein, M.J. & Hansson, S.R. (2011), "Differential gene expression analysis of placentas with increased vascular resistance and Pre-eclampsia using whole-genome microarrays", *Journal of Pregnancy*, Vol. 2011, pp. 1-12.
7. Chelbi, S.T. & Vaiman, D. (2008), "Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia", *Molecular and cellular endocrinology*, Vol. 282, pp. 120-129.
8. Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., Hanspers, K., Isserlin, R., Kelley, R., Killcoyne, S., Lotia, S., Maere, S., Morris J., Ono, K., Pavlovic, V., Pico, A.R., Vailaya, A., Wang, P., Adler, A., Conklin, B., Hood, L., Kuiper, M., Sander, C., Schmulevich, I., Schwikowski, B., Warner, G.J., Ideker, T & Bader, G.D. (2007), "Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape", *Nature Protocols*, Vol. 2 No.10, pp. 2366-2382.
9. Devergne, O., Coulomb-L'Herminé, A., Capel, F., Moussa, M. & Capron, F. (2001), "Expression of the Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts", *The American Journal of Pathology*, Vol. 159 No. 5, pp. 1763-1776.
10. Dijke, P.T. & Arthur, H.M. (2007), "Extracellular control of TGFβ signaling in vascular development

- and disease”, *Nature Reviews*, Vol. 8, pp. 857-869.
11. Enquobahrie, D.A., Meller, M., Rice, K., Psaty, B.M., Siscovick, D.S. & Williams A.M. (2008), “Differential placental gene expression in preeclampsia”, *American journal of obstetrics and gynecology*, Vol. 199 No. 5, pp. 566.e1–11.
 12. Guo, J., Tian, T., Lu, D., Xia, G., Wang, H. & Dong, M. (2012), “Alterations of maternal serum and placental follistatin-like 3 and myostatin in pre-eclampsia”, *Journal of Obstetrics and Gynecology Research*, Vol. 38 No. 7, pp. 988-996.
 13. Hladunewich, M., Karumanchi, S.A. & Lafayette, R. (2007), “Pathophysiology of the clinical manifestations of Preeclampsia”, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, Vol. 2 No. 3, pp. 543-549.
 14. Iciek, R., Wender-Ozegowska, E., Zawiejska, A., Mikolajczak, P., Mrozikiewicz, P.M., Pietryga, M. & Brazert, J. (2013), “Placental leptin and its receptor genes expression in pregnancies complicated by type 1 diabetes”, *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 64 No. 5, pp. 579-585.
 15. Inagaki, A., Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Inuzuka, H., Miyamura, H., Sekiya, T., Kurahashi, H. & Udagawa, Y. (2012), “Up-regulation of HTRA4 in the placentas of patients with severe preeclampsia”, Vol. 33, pp. 919-926.
 16. Kajii, T. & Ohama, K. (1977), “Androgenetic origin of hydatidiform mole”, *Nature*, Vol. 268 No. 5621, pp. 633-634.
 17. Kellis, M., Wold, B., Snyder, M.P., Bernstein, B.E., Kundaje, A., Marinov, G.K., Ward, L.D., Birney, E., Crawford, G.E., Dekker, J., Dunham, I., Elnitski, L.L., Farnham, P.J., Feingold, E.A., Gerstein, M., Giddings, M.C., Gilbert, D.M., Gingeras, T.R., Green, E.D., Guigo, R., Hubbard, T., Kent, J., Lieb, J.D., Myers, R.M., Pazin, M.J., Ren, B., Stamatoyannopoulos, J.A., Weng, Z., White, K.P. & Hardison, R. (2014), “Defining functional DNA elements in the human genome”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 111 No. 17, pp. 6131-6138.
 18. Louwen, F., Muschol-Steinmetz, C., Reinhard, J., Reitter, A. & Yuan, J. (2012), “A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in Preeclampsia”, *Oncotarget*, Vol. 3 No. 8, pp. 759-773.
 19. Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Kato, T., Sekiya, T., Kurahashi, H. & Udagawa Y. (2011), “Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe preeclampsia and unexplained fetal growth restriction”, *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 9 No. 107, pp. 1-12 pp.
 20. Okano, M., Yamamoto, H., Ohkuma, H., Kano, Y., Kim, H., Nishikawa, S., Konno, M., Kawamoto, K., Haraguchi, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yokobori, T., Mimori, K., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M. & Ishii, H. (2013), “Significance of INHBA expression in human colorectal cancer”, *Oncology*, Vol. 30 No. 6, pp. 2803-2908.
 21. Oshima, T., Yoshihara K., Aoyama, T., Hasegawa, S., Sato, T., Yamamoto, N., Akito, N., Shiozawa M., Yoshikawa, T., Numata, K., Rino, Y., Kunisaki, C., Tanaka, K., Akaide, M., Imada, T. & Masuda, M. (2014), “Relation of INHBA gene expression to outcomes in gastric cancer after surgery”, *Anticancer Research*, Vol. 34 No. 5, pp. 2303-2309.
 22. Perrin, D., Ballestar, E., Fraga, M.F., Frappart, L., Esteller, M., Guerin, J.F. & Dante, R. (2007), “Specific hypermethylation of LINE-1 elements during abnormal overgrowth and differentiation of human placenta”, *Oncogene*, Vol. 26, pp. 2518-2524.
 23. Powe, C.E., Levine, R.J. & Karumanchi, S.A. (2011), “Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: The role of antiangiogenic factor and implications for later cardiovascular disease”, *Circulation*, Vol. 123, pp. 2856-2869.
 24. Reimer, T., Koczan, D., Gerber, B., Richter, D., Thiesen, H.J & Friese, K. (2002), “Microarray analysis of differentially expressed genes in placental tissue of pre-eclampsia: up-regulation of obesity-related genes”, *Molecular Human Reproduction*, Vol. 8 No. 7, pp. 674-680.
 25. Reyna-Villasmil, E., Briceño-Pérez, C. & Torres-Cepeda, D. (2009), “Inmunología, inflamación y Preeclampsia”, *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, Vol. 69 No. 2, pp. 97-110.
 26. Sitras, V., Paulssen, R.H., Gronaas, H., Leirvik, J., Hanssen, T.A., Vartun, A., Acharya, G. (2009), “Differential placental gene expression in severe Preeclampsia”, *Placenta*, Vol. 30, pp. 424-433.
 27. Schroeder, D.I., Blair, J.D., Lott, P., Ken, H.O., Hong, D., Crary, F., Ashwood, P., Walker, C., Korf, I., Robinson, W.P. & LaSalle, J.M. (2013), “The human placenta methylome”, *Proceedings of the natio-*

- nal academy of sciences, Vol. 110 No. 15, pp. 6037-6042.
28. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003), "Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks", *Genome Research*, Vol. 13, pp. 2498-2504.
 29. StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
 30. Sundrani, D. P., Reddy, U. S., Joshi, A.A., Mehendale, S.S., Chavan-Gautam, P.M., Hardikar, A.A., Chandak, G.R. & Joshi, S.R. (2013), "Differential placental methylation and expression of VEGF, FLT-1 and KDR genes in human term and preterm preeclampsia", *Clinical epigenetics journal*, Vol. 5, pp. 1-11.
 31. Tejera, E., Bernardes, J. & Rebelo, I. (2012), "Preeclampsia: a bioinformatics approach through protein-protein interaction networks analysis" *BMC Systems Biology*, Vol. 6 No. 97, pp. 1-9.
 32. Tejera, E., Bernardes, J. & Rebelo, I. (2013), "Co-expression network analysis and genetic algorithms for gene prioritization in Preeclampsia", *BMC Medical Genomics*, Vol. 6 No.51, pp 1-10
 33. Toft, J.H., Lian, I.A., Tarca, A.L., Erez, O., Espinoza, J., Eide, I.P., Bjorge, L., Sun, C., Draghici, S., Romero, R. & Austgulen, R. (2008), "Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PIGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies", *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, Vol. 21 No. 4, pp. 267-273.
 34. Trifonova, E.A., Gabdulina, T.V., Ershov, N.I., Serebrova, V.N., Vorozhishcheva, A.Y. & Stepanov, V.A. (2014), "Analysis of the placental tissue transcriptome of normal and preeclampsia complicated pregnancies", *Acta Naturae*, Vol. 6 No. 2, pp. 71-83.
 35. Valencia, E.Y., Canto, T., López, L.B., Coral, R.M. & Canto, P. (2011), "Avances de la genética de la preeclampsia", *Revista de especialidades médico-quirúrgicas*, Vol. 16 No. 3, pp. 163-168.
 36. Van Der Hoorn, M.L., Keijser, R., Ris-Stalpers, C., Afink, G., Claas, F.H., Van Der Post, J.A & Scherjon, S.A. (2010), "Increased EBI3 expression in placentas of preeclamptic patients", *Journal of Reproductive Immunology*, Vol. 81, pp. 1-61.
 37. Wang, L., Cheong, M., Lee, Y., Lee, M. & Chen, H. (2012), "High-Temperature Requirement Protein A4 (HtrA4) suppresses the fusogenic activity of Syncytin-1 and promotes trophoblast invasion", *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 32 No. 18, pp. 3707-3717.
 38. Xiang, Y., Cheng, Y., Li, Xiaotian, Li, Q., Xu, J., Zhang, J., Liu, Y., Xiang, Q., Wang, L., He, L. & Zhao, X. (2013), "Up-regulated expression and aberrant DNA methylation of LEP and SH3PXD2A in Preeclampsia", *PLoS ONE*, Vol. 8(3), 1-9 pp.