

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA: QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA_m DE
MUESTRAS DE EXUDADO CERVICOVAGINAL.**

PROYECTO GENÉRICO: EVALUACIÓN DE PRODUCTOS RELACIONADOS
CON LA SALUD.

LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN:

UNIDAD DE VINCULACIÓN CIENTÍFICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA,
UNAM EN EL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)
Y LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR N-103 UIDIS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO, DEL
01 DE OCTUBRE DE 2019 – 01 DE ABRIL DE 2020.

PRESENTA:

GARCÍA CARRILLO ERICK RODRIGO

MATRÍCULA: 2142033718

ASESOR INTERNO.

DR. ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ. No. Económico: 35583

ASESOR EXTERNO.

DRA. NOEMI MERAZ CRUZ. No. de cédula: 5627331

Octubre de 2022.

1. Resumen.

En este trabajo se presenta la estandarización de un método de extracción y purificación de RNA de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas. Se realizó la búsqueda en la literatura, de artículos donde se utilizarán diferentes procedimientos de toma de muestra, así como el uso de diferentes *kits* para la extracción y purificación del ácido nucleico. Haciendo la comparación y describiendo ventajas y desventajas de su uso. Además, se documentó la eficacia de utilizar hisopo con cabeza de algodón en comparación con la de cepillo para toma de muestra en mujeres embarazadas, se comentó la utilidad de usar algún estabilizador de RNA para conservar lo mejor posible la muestra y utilizar métodos de extracción sencillos como el reactivo *TRIZOL*[™] que no afectan la calidad y cantidad del RNA obtenido, concluyendo que se debe de tomar en cuenta el material utilizado en la toma de muestra, el tipo de tubo, el conservante y la temperatura de almacenaje para evitar afectar la extracción de RNA como se demuestra en este trabajo.

2. Introducción.

El parto prematuro (PP) se define como el nacimiento antes de las 37 semanas de gestación (Callahan, B. J., 2017), las causas más frecuentes que provocan un parto prematuro son las infecciones de tipo vaginosis bacteriana, enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión) y por factores genéticos (OMS, 2018). El PP es la segunda causa de muerte neonatal en todo el mundo y la principal de mortalidad infantil en las economías de ingresos medios y altos (Liu L., 2016). De los 414,000 nacimientos que se registraron en México durante 2019 en los hospitales y clínicas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 40,411 fueron neonatos prematuros (9.75%) (IMSS, 2019). Los neonatos sobrevivientes a menudo sufren deficiencias motoras y sensoriales, problemas de aprendizaje y trastornos respiratorios (Richard G. Brown, 2018).

La genética materna-fetal y las interacciones genético-ambientales juegan un papel en la determinación de la duración de la gestación. Informes recientes del microbioma en mujeres embarazadas han sugerido que la composición del microbiota vaginal tiene un impacto significativo en el riesgo de parto prematuro (Fettweis, J. M., 2019).

La investigación del microbioma se realizó durante mucho tiempo por métodos microscópicos, permitiendo inspeccionar bacterias individuales por vía ocular y métodos basados en cultivos que nos permitían aislar y cultivar bacterias individuales en grandes poblaciones. Sin embargo, estos métodos son limitados y han estimulado el desarrollo de nuevas metodologías para comprender las comunidades bacterianas, incluido el microbioma vaginal (Berman, H.L., 2020).

Los avances en los métodos experimentales y el desarrollo de herramientas bioinformáticas de alto rendimiento han mejorado sustancialmente nuestra comprensión de las comunidades microbianas asociadas con los nichos humanos. Muchos estudios han documentado que los cambios en la abundancia microbiana y la composición del microbioma humano están asociados con la salud humana y la enfermedad. (Bikel, S., 2015). La mayoría de las investigaciones sobre el microbioma humano se enfoca típicamente en el análisis de un nivel de información biológica, es decir, metagenómica (DNA) o metatranscriptómica (RNA)(Liao, W. N., 2016).

La obtención de RNA de excelente calidad constituye la base para el desarrollo de métodos para el estudio de metatranscriptómica. Una mala calidad compromete los resultados posteriores a la extracción, lo que repercute en tiempo adicional y altos costos. Extraer RNA no es sencillo, esta molécula es menos estable que el DNA y la presencia de contaminantes como RNAsas pueden afectar su obtención. La obtención de exudado cérvico vaginal, previa firma de consentimiento informado por parte de las pacientes se ha propuesto como un método indoloro, conveniente y de bajo costo, que se puede utilizar para posteriormente obtener RNA de las células presentes en esta zona para estudios de genómica funcional. (Fernández-Martínez L., 2017).

3. Justificación.

El reactivo *TR/zo*TM (Invitrogen, CA, USA), está diseñado para aislar el RNA total (RNA_t) de alta calidad de muestras celulares y tisulares de origen humano, animal, vegetal, de levadura o bacteriano. Se pretende proponer su uso en este proyecto, donde a partir de RNA_t se puede obtener RNA_m que será utilizado para la creación de un banco de DNA complementario (DNA_c) para desarrollar estudios de metatranscriptómica. La extracción con este reactivo comparado con *kits* que se venden en el mercado para el mismo fin, en costo, es de los más accesibles, sin embargo, requiere de ciertas adecuaciones para obtener el RNA_m. En el laboratorio se buscó estandarizar un método que con diferentes pasos agregados nos llevarán a obtener RNA_m de excelente calidad y con alto rendimiento ya que el origen de las muestras sería a partir de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas. Esta técnica sería comparada con al menos un *kit* comercial, que se vende para este fin y cuyo costo es por demás elevado al anterior. Nuestros resultados evaluarían rendimiento y calidad del ácido nucleico resultante, discutiendo ventajas y desventajas al utilizar la técnica de *TR/zo*TM contra el *kit* sugerido en el mercado. La estandarización de la técnica en esta primera fase del estudio pretendía ser utilizada en el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras. Además, de hacerla compatible con la toma de muestra, entidad que posee características que deberían ser tomadas en cuenta.

Los *kits* utilizados para aislamiento de RNA_m de la marca RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) han sido utilizados para el aislamiento de este ácido nucleico a partir de una variedad de materiales de muestra (sangre entera, hisopos, fluidos biológicos y cultivos). En el laboratorio se realizarán las adecuaciones pertinentes para utilizarlo en el aislamiento de RNA_m proveniente de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas, se evaluará su rendimiento y la calidad de este ácido nucleico, el cual se pretende utilizar para crear DNA complementario (cDNA). Este será al menos un *kit* propuesto para comparar contra nuestra técnica desarrollada.

Debido a la contingencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-CoV-2 iniciada en marzo del 2020 en México, limitó la continuación del proyecto de investigación experimental permitiendo solo la revisión bibliográfica del mismo, por lo tanto, en esta versión se revisaron 2 métodos, por un lado, el método de extracción con reactivo *TRIzol*[™] y por el otro con el *kit RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) (Invitrogen, CA, USA)* comentando las ventajas y desventajas en su uso.

4. Objetivo general.

- 4.1** Estandarizar la técnica de extracción y purificación de RNA de muestras obtenidas de la región cervicovaginal de mujeres embarazadas en diferentes trimestres de gestación.

5. Objetivos específicos.

- 5.1** Estandarizar el método de obtención de la muestra a partir de exudados cervicovaginales.
- 5.2** Estandarizar la técnica para el aislamiento y purificación de RNA utilizando el reactivo *TRIzol*[™] y el *kit RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) (Invitrogen, CA, USA)* en muestras de exudado cervicovaginal.
- 5.3** Realizar un análisis cualitativo de RNA obtenido de muestras de la región cervicovaginal mediante una electroforesis en gel de agarosa.
- 5.4** Realizar un análisis cuantitativo de RNA obtenido de muestras de la región cervicovaginal mediante el equipo *NanoDrop*.
- 5.5** Iniciar un banco de RNA con la obtención de estas muestras.

6. Metodología.

6.1 Muestras.

Se realizó la búsqueda bibliográfica para la estandarización de la técnica de extracción y purificación de RNA de muestras obtenidas de la región cervicovaginal de mujeres embarazadas en diferentes trimestres de gestación en la base de datos de pubmed, desde el año 2017 a la fecha, tomando en cuenta siempre los más recientes y así poder cumplir con los objetivos descritos.

El protocolo fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética de la facultad de medicina UNAM (FM-DI/064/2019) y todas las mujeres que participarán deberán firmar un consentimiento informado por escrito. (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ, Declaración de Helsinki, 2017).

Se recolectarán muestras de exudado cervicovaginal con la ayuda de un hisopo con punta de algodón que será almacenado en un microtubo rígido con *RNAlater* y se almacenará a una temperatura de 4°C. La extracción se realizará a la muestra contenida en el microtubo rígido utilizando el reactivo *TRIzol™* y el *kit RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) (Invitrogen, CA, USA)* como lo indica el fabricante.

6.2 Estandarización del método de obtención de muestras.

La toma de muestras se realiza a partir de exudados cervicovaginales mediante el uso de hisopos con punta de algodón para coleccionar muestras de fondo de saco vaginal, una vez recolectada la muestra esta será conservada en un tubo rígido con *RNAlater*, estos se almacenarán y transportarán a una temperatura de 4 °C. Una vez en el laboratorio, los hisopos se sacarán de los tubos rígidos procurando exprimirlos contra los muros del tubo para asegurar la mayor extracción de células posibles, se sugiere centrifugar el tubo con muestra a máxima velocidad hasta la formación de un pellet celular, después desechar el sobrenadante, en el cual venia el hisopo, estos tubos ya sin hisopo se almacenarán a una temperatura de 4°C hasta su uso. (*RNAlater, QIAGEN, (2010)*).

6.3 Estandarización de la técnica para el aislamiento y purificación de RNA en muestras de exudado cervicovaginales.

Uno de los métodos que se utiliza para el aislamiento y purificación de RNA en muestras de exudado cervicovaginal revisada fue con reactivo de *TRIzol™ (Invitrogen, CA)*. En este método se añaden 1500 µL de reactivo *TRIzol™ (Invitrogen, CA)* al tubo para homogenizar pipeteando de arriba a abajo varias veces. Se deja a temperatura ambiente por 5 minutos, se añaden 450 µL de cloroformo (ayuda a la separación de proteínas y lípidos) y se deja a temperatura

ambiente por 3 minutos. Colocar en hielo por 5 minutos, centrifugar la muestra por 15 minutos a 12300 rpm, transcurrido este tiempo se debe observar una separación de fases en el tubo tipo eppendorf: una fase orgánica roja-rosa (en el fondo del tubo), una interfase lechosa (separa la fase orgánica y la acuosa) y una fase acuosa transparente (en la parte superior del tubo). La fase acuosa se debe de transferir a un tubo nuevo, después añadir 750 μ L de isopropanol (ayuda a precipitar el RNA), homogenizar y dejar por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar durante 10 minutos a 4°C, se debe de formar un precipitado de RNA en forma de precipitado blanco en el fondo del tubo y se desecha el sobrenadante.

Se suspende el precipitado añadiendo 1500 μ L de etanol al 75% (ayuda a desechar el remanente), mezclar en un vortex, centrifugar durante 5 minutos a 9800 rpm y dejar a temperatura ambiente hasta que todo el etanol se evapore. Resuspender el precipitado añadiendo de 20-50 μ L de agua libre de nucleasas, incubar en baño maría a 55-60°C durante 15 minutos. El RNA queda listo para análisis posteriores y este se debe almacenar a -70°C. (TRIZOL™ *Reagent user guide*, 2016).

Diagrama de flujo reactivo TRIZOL™

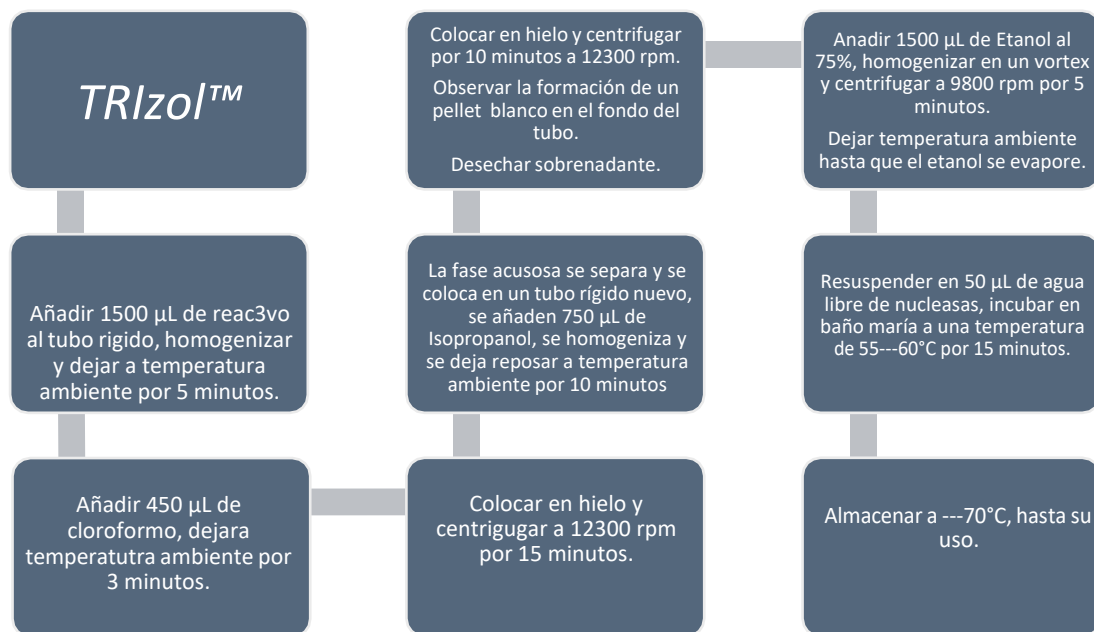


Figura 1. Procedimiento para la extracción de RNA utilizando reactivo TRIZOL™

La técnica que se compara contra la técnica citada anteriormente son los kits utilizados para aislamiento de RNA_m de la marca RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) (Invitrogen, CA, USA), que han sido utilizados para el aislamiento de este ácido nucleico a partir de una variedad de materiales de muestra (sangre entera,

(QIAGEN) (*Invitrogen, CA, USA*), el cual indica que se deben añadir 650 μL de solución PM1/ β ME (ayuda a homogenizar y precipitar la muestra), agitar en un vortex a máxima velocidad por 10 minutos y centrifugar a 12900 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 150 μL de solución ISR (ayuda a eliminar contaminantes), agitar en un vortex, alcanzar una temperatura de 4°C colocando la muestra en hielo por 5 minutos y centrifugar por 1 minuto. Añadir 650 μL de solución PM3 (carga positivamente el RNA, facilitando su unión a la membrana inorgánica) y 650 μL de etanol al 70% (ayuda a desechar remanentes), agitar y transferir 650 μL del sobrenadante al tubo *MB RNA Spin column*, proporcionado por el *kit*, centrifugar por 1 minuto y el líquido que pase por el tubo *MB RNA Spin column* se desecha.

Añadir 650 μL de solución PM5, centrifugar por 1 minuto para eliminar residuos, colocar en un tubo nuevo, añadir 50 μL de solución DNase I en el centro del tubo y dejar reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Después añadir 400 μL de solución PM7 (ayuda a inactivar la solución *DNase I*), centrifugar por 1 minuto y desechar el líquido que pase por el tubo *MB RNA Spin column*. Añadir 650 μL de solución PM5, centrifugar por 1 minuto y desechar el líquido que pase por el tubo *MB RNA Spin column*.

Añadir 650 μL de solución PM4 (ayuda a eliminar contaminantes), centrifugar por 1 minuto y desechar el líquido que pase por el tubo *MB RNA Spin column*. Centrifugar por 2 minutos y el tubo *MB RNA Spin column* se debe colocar en un tubo nuevo, añadir 50 μL de solución PM8 en el centro de la membrana del tubo *MB RNA Spin column*, dejar reposar por 1 minuto. Por último, centrifugar por 1 minuto, desechar el tubo *MB RNA Spin column* y el RNA queda extraído en el fondo del tubo y listo para aplicaciones posteriores. (*RNeasy® PowerMicrobiome® kit handbook*, 2020).

6.4 Análisis cualitativo de RNA obtenido de muestras de la región cervicovaginal mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para este punto, una vez obtenido el RNA por ambas técnicas de la misma muestra, se recomienda continuar con el análisis del material obtenido por medio de geles de agarosa. Se pesarán 2 g de agarosa en la balanza analítica, esta se disolverá en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de buffer TBE 1x.

Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta lograr una mezcla homogénea, sin llegar a la ebullición. Preparar la bandeja, el molde y el peine, verter la mezcla caliente de agarosa en el molde, colocar el peine y dejar enfriar hasta que el gel polimerice. (Fierro, F. F. 2014).

Retirar el peine y colocar en la cámara de electroforesis, teniendo en cuenta que los posos queden cerca del electrodo negativo (negro). Llenar la cámara con

buffer TBE 1x hasta sumergir completamente el gel. Mezclar 2 μL de *Gel Red* o *RedLabel* (contiene un fluoróforo y sirve como buffer de carga) con 3 μL de muestra y con ayuda de una micropipeta de 0.5 – 10 μL colocar en el pozo correspondiente. Cerrar la cámara y conectar a la fuente de poder, programar una corriente de 100 V durante 30 minutos. Observar el desplazamiento de la muestra en el gel para después colocar en un iluminador de luz Uv. y visualizar la calidad de las bandas. (Fierro, F. F. 2014).

Diagrama de flujo reactivo *RNeasy® PowerMicrobiome®* (QIAGEN) (*Invitrogen, CA, USA*)

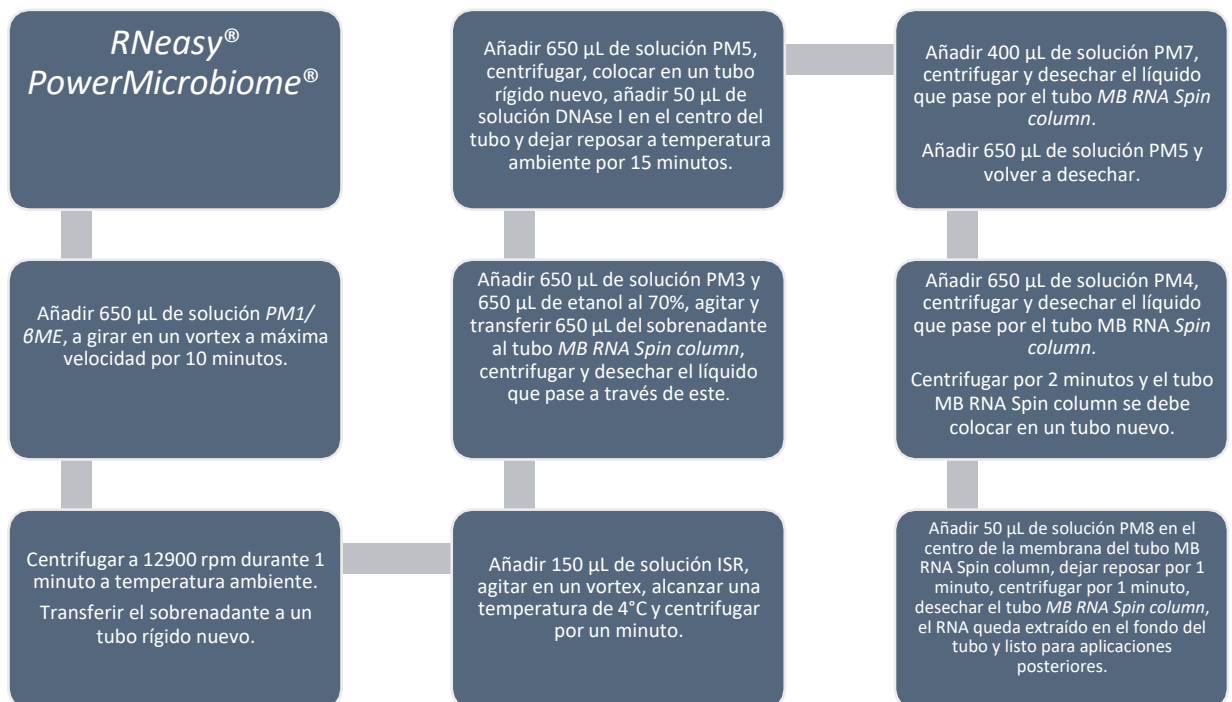


Figura 2. Procedimiento para la extracción de RNA utilizando reactivo *RNeasy®*

6.5 Análisis cuantitativo de RNA.

Se utilizará el equipo *Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c* para la cuantificación del RNA obtenido de las muestras (*NanoDrop, 2010*).

Seleccionar RNA en la pantalla del equipo, realizar un lavado con 1 μL de agua libre de nucleasas y colocar en el pedestal inferior, cerrar la tapa y dar clic en “*Blank*”, una vez limpio se procede a analizar 1 μL de RNA extraído con el reactivo *TRIZOL™* (*Invitrogen, CA, USA*) y 1 μL de RNA extraído con el *kit RNeasy® PowerMicrobiome®* (*QIAGEN*) (*Invitrogen, CA, USA*), dar clic en “*Measure*” para que el equipo registre los resultados (*NanoDrop, 2010*).

6.6 Síntesis de cDNA para creación de un banco de datos.

Debido a la contingencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-CoV-2 iniciada en marzo del 2020 en México, limitó la continuación del proyecto de investigación experimental, lo que provocó que las muestras de RNA se mantuvieran en congelación hasta su uso. No se logró sintetizar cDNA a partir de estas muestras.

7. Resultados.

La ventaja de utilizar hisopos con cabeza de algodón para recolectar las muestras cervicovaginales en mujeres embarazadas reside en la comodidad y facilidad de su uso.

Una de las desventajas del hisopo con cabeza de algodón es la cantidad de muestra recolectada.

La ventaja de utilizar tubos tipo eppendorf blandos es la posibilidad de poder exprimir el hisopo, así maximizando la cantidad celular extraída manteniendo su estabilidad, ya que al utilizar tubos rígidos se ve complicado exprimir el hisopo comprometiendo la cantidad de muestra extraída y la estabilidad de este.

7.1 Técnica de extracción y purificación.

Se extrajo el RNA total de los sedimentos celulares usando reactivo *TRIzol*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, demostrando su efectividad.

Una ventaja de la extracción con reactivo *TRIzol*TM es que este demuestra ser eficaz para extraer RNA de muestras cervicovaginales.

Una ventaja de usar *kits* de extracción de la marca QIAGEN es que demuestran ser eficaces para extraer RNA.

Una de las desventajas de utilizar *kits* comerciales como los de la marca QIAGEN es el costo, ya que, comparándolo con el reactivo *TRIzol*TM resulta tener un costo más alto.

8. Discusión.

Una desventaja al usar hisopo con cabeza de algodón es la cantidad de muestra obtenida para la extracción de RNA, esto se ha demostrado en el artículo de

Graves, K., *et al*, donde se utilizó este tipo de hisopo para extraer RNA de muestras cervicovaginales de mujeres embarazadas con una posible infección con levaduras, a pesar de las 355 muestras obtenidas en el artículo la extracción del RNA fue mínima, a comparación con las muestras obtenidas con hisopo de cabeza de cepillo.

Se menciona en el artículo Chong, *et al*. (2020), que utilizar hisopo con cabeza de cepillo ayuda a maximizar la obtención de muestra celular para la extracción de RNA, también indica que, la recolección con este tipo de hisopo es más incómoda, dato a considerar para la obtención de muestra en mujeres embarazadas.

La extracción de RNA en muestras almacenadas en tubos blandos indica una mayor cantidad y calidad de este, como se demuestra en el artículo de Chong, *et al*. (2020).

Al utilizar un estabilizador de RNA se deben considerar aspectos como su viscosidad, precio y funcionalidad ya que este puede mejorar o limitar la cantidad y calidad de este.

El reactivo *TRIzol*TM muestra resultados confiables a pesar de tener años en el mercado, sigue siendo utilizado como se ve en artículos recientes como en el de Chong, *et al*. (2020) gracias a su eficiencia y bajo costo, frente a *kits* que se encuentran en el mercado.

La obtención de RNA de excelente calidad constituye la base para el desarrollo de técnicas para el estudio de metatranscriptómica. Una mala calidad compromete los resultados posteriores a la extracción, lo que repercute en tiempo adicional y altos costos. Extraer RNA no es sencillo, esta molécula es menos estable que el DNA y la presencia de contaminantes como RNAsas pueden desafiar su obtención, como se demuestra el artículo de Chong, *et al*. (2020).

9. Conclusión.

Se logró estandarizar la técnica de extracción y purificación de RNAm de muestras obtenidas de la región cervicovaginal de mujeres embarazadas con el método *TRIZOL*[™] y el *kit RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) (Invitrogen, CA, USA)*

Se encontró bibliográficamente que el método *TRIZOL*[™] es el más utilizado, certero, eficaz y confiable para la obtención de RNA.

Se logro estandarizar la técnica de extracción y purificación de RNAm de muestras obtenidas de la región cervicovaginal de mujeres embarazadas con el *kit RNeasy® PowerMicrobiome® (QIAGEN) (Invitrogen, CA, USA)*.

Se logró analizar cualitativamente y cualitativamente las muestras obtenidas de la región cervicovaginal de mujeres embarazadas.

La temperatura, el tipo de tubo y el conservante pueden afectar la extracción de RNA como se demuestra en el artículo de Chong, *et all.* (2020).

Los datos obtenidos podrían servir para elegir un método de extracción para análisis donde se necesite extraer RNA de muestras de exudado cérvico vaginal para optimizar la calidad y concentración de este.

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académico



Dr. Alberto Ortega Vázquez
Profesor Asociado "D" TC
Departamento de Sistemas.
Biológicos. División de Ciencias
Biológicas y de la Salud. UAM Unidad
Xochimilco No. Económico: 35583



Dra. Noemí Meraz Cruz
Profesora titular TC Unidad de
Vinculación Científica de la Facultad
de Medicina, UNAM en INMEGEN
No. De cédula profesional: 5627331

10. Bibliografía.

1. Berman, H. L., McLaren, M. R., & Callahan, B. J. (2020). *Understanding and interpreting community sequencing measurements of the vaginal microbiome. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 127(2)*, 139-146.
2. Bikel, S., Valdez-Lara, A., Cornejo-Granados, F., Rico, K., Canizales-Quinteros, S., Soberón, X., & Ochoa-Leyva, A. (2015). *Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. Computational and structural biotechnology journal, 13*, 390- 401.
3. Bokharaei-Salim, F., Esteghamati, A., Khanaliha, K., Esghaei, M., Donyavi, T., & Salemi, B. (2020). *The First Detection of Co-Infection of Double-Stranded RNA Virus 1, 2 and 3 in Iranian Isolates of Trichomonas vaginalis. Iranian Journal of Parasitology, 15(3)*, 357.
4. Callahan, B. J., DiGiulio, D. B., Goltsman, D. S. A., Sun, C. L., Costello, E. K., Jeganathan, P., ... & Relman, D. A. (2017). *Replication and refinement of a vaginal microbial signature of preterm birth in two racially distinct cohorts of US women. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(37)*, 9966-9971.
5. Chong, G. O., Han, H. S., Lee, S. D., & Lee, Y. H. (2020). *Improvement in RNA quantity and quality in cervico-vaginal cytology. Virology journal, 17(1)*, 1-7.
6. Fernández-Martínez, L. (2017). Introducción de nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 33(S1)*.
7. Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Girerd, P. H., Parikh, H. I., ... & Buck, G. A. (2019). *The vaginal microbiome and preterm birth. Nature medicine, 25(6)*, 1012-1021.
8. Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27.
9. Graves, K. J., Ghosh, A. P., Schmidt, N., Augostini, P., Secor, W. E., Schwebke, J. R., ... & Muzny, C. A. (2019). *Trichomonas vaginalis virus among women with trichomoniasis and associations with demographics, clinical outcomes, and metronidazole resistance. Clinical Infectious Diseases, 69(12)*, 2170-2176.
10. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, (INCMNSZ) (2017) Declaración de Helsinki. Sitio web oficial.
11. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (2019). En el día mundial del niño prematuro, el IMSS promueve un embarazo sano para que bebés nazcan en término No.498/2019. <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201908/498>, fecha de consulta

- diciembre 2019.
12. Liao, W., Ren, J., Wang, K., Wang, S., Zeng, F., Wang, Y., & Sun, F. (2016). *Alignment-free transcriptomic and metatranscriptomic comparison using sequencing signatures with variable length markov chains*. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
 13. Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., ... & Black, R. E. (2016). *Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000– 15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals*. *The Lancet*, 388(10063), 3027-3035.
 14. *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual* (2009). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>, fecha de consulta diciembre 2019.
 15. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018). Nacimientos prematuros. Sitio web oficial. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/preterm-birth>, fecha de consulta enero 2020.
 16. Brown, R. G., Marchesi, J. R., Lee, Y. S., Smith, A., Lehne, B., Kindinger, L. M., ... & MacIntyre, D. A. (2018). *Vaginal dysbiosis increases risk of preterm fetal membrane rupture, neonatal sepsis and is exacerbated by erythromycin*. *BMC medicine*, 16(1), 1-15.
 17. *RNAlater, QIAGEN, (2010). Stabilization Solutions for Reliable Gene Expression Analysis*. <https://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=695421a4-c7ff-454e-a795-406a069a4982&lang=en>, fecha de consulta diciembre 2019.
 18. *RNeasy® PowerMicrobiome® kit handbook* (2020). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=84c1f2e7-8db6-4957-a504-92bf9f82dd84&lang=en> fecha de consulta enero 2020.
 19. Roudbarmohammadi, S., Roudbary, M., Bakhshi, B., Katirae, F., Mohammadi, R., & Falahati, M. (2016). *ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in Candida albicans isolated from vulvovaginal candidiasis*. *Advanced biomedical research*, 5.
 20. *TRIZOL™ Reagent, user guide*. (2016). https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/product-brand/trizol.html?gclid=Cj0KCQiArt6PBhCoARIsAMF5wagkR9pzaIp913Fv2M8Hp5aPmPnBe4CCYRYWmVv-j9bYICIIUhC_tYAaAsufEALw_wcB&cid=fl-trizol&s_kwcid=AL!3652!3!461396794245!b!!g!!%2Btrizol&ef_id=Cj0KCQiArt6PBhCoARIsAMF5wagkR9pzaIp913Fv2M8Hp5aPmPnBe4CCYRYWmVv-j9bYICIIUhC_tYAaAsufEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!461396794245!b!!g!!%2Btrizol?cid=bid_sap_nap_r01_co_cp1362_pjt2155_bid00000_Ose_gaw_nt_con_con, fecha de consulta diciembre.