



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“Perfil de cuatro miRNAs en suero de pacientes con desarrollo de endometriosis”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN HUMANA**

**P R E S E N T A:**

**OLGA ALEJANDRA RAMÍREZ ORDÓÑEZ**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
DR. JULIO DE LA JARA DIAZ**  
Profesor titular de la especialidad en  
Biología de la Reproducción Humana

**ASESOR CLINICO  
DRA. ANA PAOLA SANCHEZ SERRANO**  
Profesor adjunto de la especialidad en  
Biología de la Reproducción

**DIRECTOR DE TESIS  
M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA**

**MÉXICO, DF. 2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Perfil de expresión de cuatro miRNAs en suero de pacientes con desarrollo de endometriosis.**

**Expression profile of four miRNAs in serum of patients with endometriosis development**

Ramírez-Ordóñez O<sup>1</sup>., Sánchez-Serrano P<sup>2</sup>., De la Jara-Díaz J<sup>3</sup>.,  
Flores-Herrera H<sup>4</sup>

Médico Residente de la Especialidad de Biología de la Reproducción<sup>1</sup>, Profesor adjunto de la especialidad en Biología de la Reproducción<sup>2</sup>, Profesor titular de la especialidad en Biología de la Reproducción<sup>3</sup>, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular<sup>3</sup>  
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Correspondencia:

Olga Alejandra Ramírez Ordóñez, MR.

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, cp 11000

México D.F

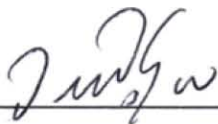
Correo electrónico: [olgaramord@hotmail.com](mailto:olgaramord@hotmail.com)

## AUTORIZACIÓN DE TESIS

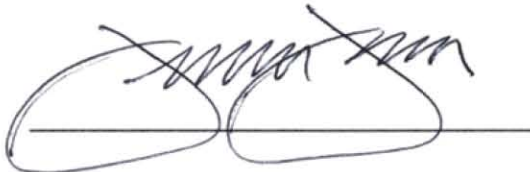
*"PERFIL DE EXPRESIÓN DE CUATRO MIRNAS DE PACIENTES CON DESARROLLO DE ENDOMETRIOSIS"*

PRESENTA:

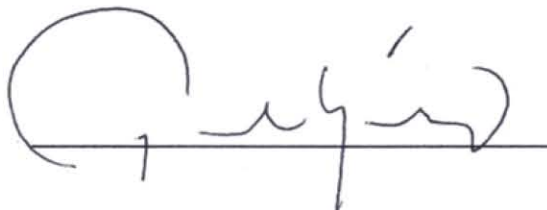
Dra. Olga Alejandra Ramírez Ordóñez



DRA. VIRIDIANA GORBEA CHAVEZ  
Dirección de Educación en Ciencias de la Salud  
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



DR. JULIO FRANCISCO DE LA JARA DÍAZ  
Profesor Titular del Curso de Biología de la Reproducción Humana  
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



DRA. ANA PAOLA SANCHEZ SERRANO  
ASESOR CLINICO  
Profesor del Curso de Biología de la Reproducción Humana  
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



M EN C. HÉCTOR FLORES HERRERA  
Director de Tesis/ Asesor metodológico  
Investigador en Ciencias Médicas.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se desarrolló con fondos federales del Instituto Nacional de Perinatología INPer mediante el proyecto con número de registro 212250-22661 otorgado a HFH. OARO es Becaria del Instituto en Salud Carlos Slim (2016-2017).

## INDICE

	<b>Página</b>
1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	5
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	9
5. RESULTADOS .....	16
6. DISCUSIÓN .....	18
7. CONCLUSIÓN .....	21
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	22
9. TABLAS Y FIGURAS .....	24

## RESUMEN

**Introducción:** La endometriosis es una enfermedad frecuente en mujeres en edad reproductiva con importantes consecuencias en la calidad de vida y en su fertilidad. El diagnóstico de endometriosis es mediante laparoscopia, sin embargo, este es un procedimiento mínimamente invasivo que requiere anestesia general y habilidad quirúrgica con un alto costo. Recientemente, numerosos estudios han demostrado la expresión de diversos miRNAs en diferentes patologías incluyendo desórdenes benignos o malignos del tracto reproductor femenino. Los miRNAs son expresados en el endometrio eutópico como ectópico. La detección de miRNAs circulantes en el plasma y otros fluidos biológicos nos da la posibilidad de utilizarlos como bio-marcadores no invasivos para el diagnóstico de la endometriosis, por lo que en el presente trabajo nos propusimos como objetivo principal determinar y cuantificar la expresión de cuatro miRNA-21, -141, 200b, y -210 en plasma de pacientes con diagnóstico de endometriosis.

**Material y métodos:** Pacientes que acudieron a la clínica de reproducción asistida por deseo de fertilidad. Cinco mililitros de sangre periférica fueron obtenidos de pacientes con diagnóstico previo de endometriosis la cual fue confirmada por laparoscopia (n=11) y pacientes sin la enfermedad (n=10). A partir de la muestra de plasma se obtuvo RNA mediante el reactivo de TRIzol. La expresión de los miRNAs fue realizada mediante RT-PCR con iniciadores específicos. Los amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 4% y la banda de amplificación fue determinada mediante la densidad óptica. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar y el análisis

estadístico se realizó mediante la prueba Mann-Whitney con una diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

**Resultados:** La edad materna ( $p = 0.268$ ), el índice de masa corporal ( $p = 0.392$ ), y la concentración de la hormona del folículo estimulante (FSH;  $p = 0.275$ ), y luteinizante (LH;  $p = 0.549$ ) de las pacientes con endometriosis no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. La expresión de los miRNA-21 ( $p = 0.008$ ), y -200b ( $p = 0.032$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de endometriosis con respecto al grupo control, aumentado 1.3 y 1.18 veces respectivamente. El miRNA-210 disminuyó 1.2-veces en las pacientes con endometriosis no mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.073$ ). Las pacientes con diagnóstico de endometriosis y que se les sometió al procedimiento de fulguración ( $n=5$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas disminuyendo la expresión del miRNA-21 ( $p = 0.002$ ), -141 ( $p = 0.03$ ), y -210 ( $p = 0.009$ ) con respecto a las pacientes a las que no se les realizó el procedimiento de fulguración ( $n=6$ ).

**Conclusiones:** En el presente estudio hemos identificado la expresión de dos miRNAs (21 y 200b) que distingue a pacientes con endometriosis y pacientes sin esta enfermedad, lo que sugiere que los miRNAs circulantes pueden servir como prometedores biomarcadores para la detección temprana de la endometriosis.

**Palabras clave:** Endometriosis, miRNA.



## ABSTRACT

**Introduction:** Endometriosis is a common disease in women of reproductive age with a significant impact on quality of life and fertility. The diagnosis of endometriosis is by laparoscopy; however, this is a minimally invasive procedure that requires general anesthesia and surgical skill with a high cost. Recently, numerous studies have demonstrated the expression of several miRNAs in different diseases including benign or malignant disorders of the female reproductive tract. MiRNAs are expressed in the eutopic and ectopic endometrium. The detection of circulating miRNAs in plasma and other biological fluids gives us the possibility to use them as noninvasive biomarkers for the diagnosis of endometriosis.

**Objective:** Identify and quantify the expression of four miRNA-21, -141, 200b, and -210 in plasma of patients with the diagnosis of endometriosis.

**Material and methods:** Patients who attended the assisted reproduction clinic for fertility desire. Five milliliters of peripheral blood were obtained from patients with a previous diagnosis of endometriosis which was confirmed by laparoscopy (n = 11) and patients without the disease (n = 10). From the plasma sample RNA was obtained by TRIzol reagent. The expression of miRNAs was performed by RT-PCR using specific primers. Amplicons were visualized on agarose gels and 4% amplification band was determined by optical density. The results are presented as

mean  $\pm$  standard deviation and statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test with a significant difference of  $p < 0.05$ .

**Results:** Maternal age ( $p = 0.268$ ), the body mass index ( $p = 0.392$ ), and the concentration of the follicle stimulating hormone (FSH;  $p = 0.275$ ), and luteinizing hormone (LH;  $p = 0.549$ ) of patients with endometriosis showed no statistically significant differences from the control group. The expression of miRNA-21 ( $p = 0.008$ ), and -200b ( $p = 0.032$ ) showed statistically significant differences between endometriosis group compared to the control group, increased 1.3 and 1.18 times respectively. The miRNA-210 decreased 1.2-fold in patients with endometriosis do not show a statistically significant difference ( $p = 0.073$ ). Patients diagnosed with endometriosis and were subjected to fulguration procedure ( $n = 5$ ) showed statistically significant differences decreasing miRNA expression of miR-21 ( $p = 0.002$ ), -141 ( $p = 0.03$ ), and -210 ( $p = 0.009$ ) with respect to patients which did not undergo the procedure fulguration ( $n = 6$ ).

**Conclusions:** In the presented study we identified the expression of two miRNAs (-21 and -200b) distinguishes patients with endometriosis and patients without the disease, suggesting that circulating miRNAs may serve as promising biomarkers for early detection of endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis, miRNA

## INTRODUCCIÓN

La endometriosis se define como la implantación de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina (1,2), siendo una enfermedad frecuente en mujeres en edad reproductiva con importantes consecuencias en la calidad de vida y en su fertilidad (1,3). A pesar de la alta prevalencia de esta patología, 6 al 10% de mujeres en edad reproductiva, el diagnóstico de endometriosis es frecuentemente tardío debido a la complejidad de la patogénesis y a la diversidad de los síntomas (3). La incidencia de la endometriosis ha sido reportada de 2.37 a 2.49/ 1000 mujeres, y su principal manifestación clínica es el dolor pélvico, dismenorrea, dispareunia e infertilidad. Dentro de las mujeres afectadas más del 50% son infértiles (4).

La endometriosis incluye una amplia variedad de lesiones en diferentes localizaciones y se pueden encontrar tres diferentes entidades; los implantes peritoneales (que se encuentran sobre el peritoneo), los endometriomas, lesiones quísticas situadas sobre ovario en las glándulas endometrioides y los nódulos rectovaginales que son tejidos fibróticos y endometriósicos que crecen en el espacio rectovaginal (1,5).

Los estudios de imagen como el ultrasonido y la resonancia nuclear magnética ofrecen cierto beneficio en el diagnóstico de endometriomas del ovario, sin embargo, muestran poca utilidad en las otras lesiones endometriales. La visualización directa de la lesión, así como su confirmación histológica por medio de procedimientos quirúrgicos, como la laparoscopia, son actualmente el estándar

de oro para el diagnóstico de endometriosis. Sin embargo, la laparoscopia es un procedimiento mínimamente invasivo, que requiere anestesia general y habilidad quirúrgica con un alto costo. Aunada a esto se ha asociado con un riesgo potencial de complicaciones intra o post operatorias (3).

Recientemente, numerosos estudios han demostrado la expresión de pequeños RNAs no codificantes, denominados microRNAs (miRNAs) en diferentes patologías, incluyendo cáncer, alteraciones cardiovasculares y en desórdenes benignos o malignos del tracto reproductor femenino (3,4,5).

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes (21-22 nucleotidos) que regulan la expresión genética por modulación post-transcripcional, y juegan un papel clave en una amplia variedad de procesos biológicos. La alteración en sus niveles puede reflejar cambios de procesos fisiológicos normales, y además estos cambios se han visto relacionados con diferentes condiciones severas patológicas, incluyendo enfermedades ginecológicas. Los microRNAs muestran tener una buena estabilidad en diferentes fluidos corporales, tales como suero, plasma, orina y saliva, esta se produce cuando los miRNA son liberados de las células hacia el espacio extracelular dentro de vesículas o unidos a proteínas (6).

La figura 1 muestra la biogénesis de los miRNAs funcionales dada por una serie secuencial de ediciones reguladas iniciándose en el núcleo (pri-miRNA) y finalizando en el citoplasma (miRNA maduro). Los miRNAs ejercen sus funciones de regulación en la misma célula que los genera y mediante exocitosis sobre

células vecinas o bien pueden ingresar a la circulación sanguínea y modular en otros sitios (figura 1).

Lawrie y colaboradores (2008) Fueron los primeros en demostrar la presencia de micro RNAs en fluidos biológicos, cuando reportaron los miRNAs asociados a tumor -155, -210 y -21, detectados en el suero de pacientes con linfoma difuso de células B (7). Desde entonces se ha demostrado que los microRNA circulantes pueden ser usados como un marcador no invasivo para otras patologías, incluyendo enfermedades autoinmunes, sepsis e infarto de miocardio (3). Los miRNAs y sus células blanco RNA mensajero (mRNA) son expresados en el endometrio eutópico como ectópico.

Dentro de la evidencia; Wang y colaboradores (2012) encontraron que los miRNA-122 y miRNA-199a estaban aumentados, y los miRNA-145, miRNA-141, miRNA-542-3p y miRNA-9 estaban disminuidos en la circulación de pacientes con endometriosis. De estos, el miRNA-145 se ha reportado aumentado en el tejido endometrioso en dos estudios independientes (8,9), este patrón de expresión sugiere una relación inversa entre la expresión del miRNA-145 en el tejido enfermo y los niveles séricos (7).

Ohlsson y colaboradores (2009) estudiaron la expresión de diferentes miRNAs por microarray en tejido endometrial ectópico y eutópico, encontrando 14 miRNAs aumentados (-1, -29c, -99a, -99b, -100, -125a y b, -126, -143, -145, -150, -194, -223 y -365) y 8 miRNAs disminuidos (-20a, -34c, -141, -142-3p, -196b, -200a, -200b y -424). Hawkins y colaboradores (2011) estudiaron la expresión de varios miRNAs en pacientes con endometriosis, encontrando 10 miRNAs aumentados

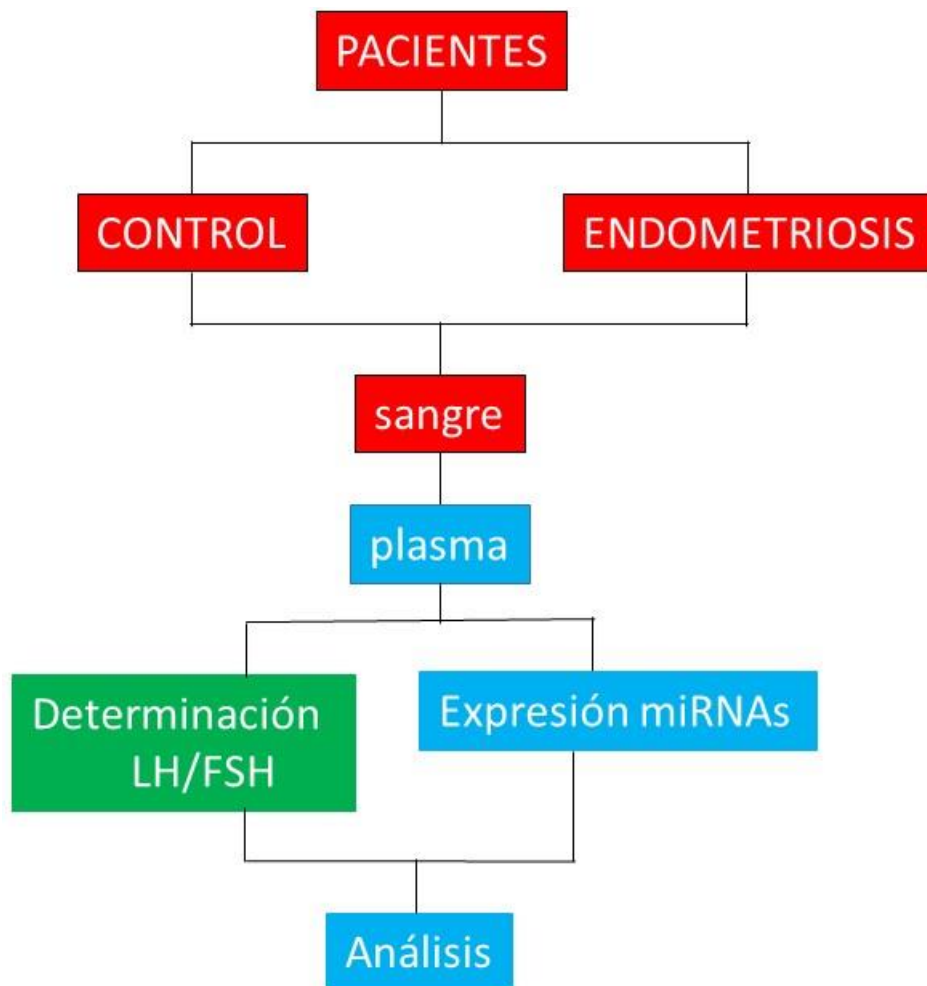
(-29c, -100, -193a-3p, -193a-5p, -202, -485-3p, -509-3-5p, -574-3p, -708 y -720) y 12 miRNAs disminuidos (-10a, -34c-5p, -141, -200a, -200b, -200c, -203, -375, -429, -504, -873 y -449b) comparados con pacientes control (4).

Suryawanshi y colaboradores (2013) encontraron una sobre-expresión en el plasma/suero de pacientes con cáncer de ováριο del miRNA-21 y miRNA16 (8). Se han reportado niveles elevados del miRNA-200a y miRNA-200b en pacientes con cáncer, incluido cáncer de ovario (10) y cáncer pancreático (11), así mismo una elevada expresión del miRNA-141 se encontró en plasma de pacientes con cáncer de colon avanzado (12). Finalmente Rekker y colaboradores (2015) encontraron una menor expresión en suero de los miRNA-200a y miRNA-141 en pacientes con endometriosis comparada con pacientes sin evidencia por laparoscopia de esta enfermedad, demostraron que los miRNA-200a, miRNA-200b y miRNA-141 no se expresan de manera diferente en el tejido endometrial de pacientes con y sin endometriosis, por lo que al parecer el endometrio no es el tejido de origen de las alteraciones en plasma de los miRNAs -200 (6).

La detección de miRNAs circulantes en el plasma y otros fluidos nos da la posibilidad de utilizarlos como bio-marcadores no invasivos para el diagnóstico de la endometriosis. El objetivo principal de nuestro estudio fue analizar la expresión de los miRNA-21, 210, 200b y 141 en plasma de pacientes con o sin endometriosis.

## DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO.

La figura 2 muestra el procedimiento general para el análisis de los micros RNAs:



Las pacientes fueron valoradas y clasificadas como sanas (control) o con endometriosis (casos) y en todos los casos se obtuvo 5 mL de sangre (clínica de infertilidad del departamento de Biología de la Reproducción). La sangre fue procesada para la obtención del suero y la expresión de los miRNAs fue analizada en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular. La

determinación de la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH) fue analizada en el laboratorio central. Todos los servicios pertenecen al Instituto Nacional de Perinatología.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Características de los pacientes.

Se incluyeron pacientes de sexo femenino quienes acudieron a la clínica de Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología para realizar protocolo de estudio por infertilidad primaria o secundaria. Se ingresaron pacientes con diagnóstico de endometriosis realizado por laparoscopia así como pacientes sin este diagnóstico. Se excluyeron pacientes que presentaran cualquier proceso inflamatorio, (incluyendo obesidad mórbida) diagnosticado clínica o bioquímicamente, cirugía previa reciente, cáncer, enfermedad autoinmune o presencia de alguna enfermedad crónica degenerativa.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado entregando una copia a la paciente y anexando original al expediente. Para valorar el grado de endometriosis se utilizó la clasificación determinada por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, por sus siglas en inglés) como estadio I (enfermedad mínima), estadio II (enfermedad leve), estadio III (enfermedad moderada) y estadio IV (enfermedad grave). La severidad de la enfermedad se clasificó como mínima-leve (I-II) reportada en 6 pacientes y moderada-grave (III-



IV) reportada en 5 pacientes. En las pacientes con estadio III-IV se encontró endometriomas ováricos.

#### Obtención de las muestras

Cinco mililitros de sangre periférica fue obtenida por punción de la vena cefálica y se colectó en tubos que contengan K2-EDTA (BD Vacutainer) y fueron centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. Posteriormente 500 µl de suero fueron mezclados con el mismo volumen del reactivo de TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA) y se prosiguió a la obtención del RNA con las recomendaciones de la casa comercial.

#### Extracción del RNA.

El suero y la mezcla con TRIzol fueron agitados vigorosamente en vortex por 15 segundos y se incubaron 15 minutos a 30°C. Posteriormente se les agregó 100µL de cloroformo y se agitaron nuevamente por 15 segundos y se incubaron nuevamente por tres minutos a 30°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 15 minutos a 4000 rpm a 2°C. Al término se formaron tres fases: acuosa (RNA), interface (DNA) y orgánica (proteínas y lípidos; figura 3).

Se recuperó la fase acuosa (RNA) a la cual se le agregó 2 µl de glucógeno y 500 µl de isopropanol. Las muestras se vuelven a agitar en las condiciones arriba mencionadas y se incubaron por 1hr a -20°C. Al terminar la incubación las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 30 min y el sobrenadante fue retirado, a la pastilla (RNA) se le dio dos veces el siguiente tratamiento: se le adicionó 1 mL de etanol al 75% y se agitó vigorosamente por 15 seg.,

posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm por 15 min. Finalmente, las muestras fueron cubiertas y secadas toda la noche por inversión.

Al siguiente día las muestras fueron hidratadas con 50  $\mu$ l de agua milliQ y se determinó la concentración de RNA para lo cual se tomaron 1  $\mu$ l de la muestra y se les adicionó 99  $\mu$ l de agua milliQ. Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría a 450 nm de longitud.

#### Reacción de la Transcriptasa Reversa (RT)-PCR.

Para determinar el perfil de expresión de los cuatro miRNA se utilizó el método de transcriptasa reversa (RT) la cual convierte la cadena de RNA en una de cadena complementaria de DNA (cDNA).

Este procedimiento consistió en incubar el RNA a 65°C por 15 minutos y rápidamente enfriado en hielo por 5 min. Posteriormente se tomó 1  $\mu$ l de RNA y en tubo de PCR se añadieron 20 pmol de iniciadores (tabla 1), 1  $\mu$ l de la mezcla de nucleótidos (DNTPs: adenina, guanina, citocina y uracilo; 10 mM, Invitrogen), la mezcla fue incubada sucesivamente en 65°C durante 5 min., y hielo por 1 minuto. Las muestras fueron centrifugadas por un pulso (10 seg). Se preparó la mezcla para cada muestra por separada 10 mM (4  $\mu$ l; 5X First-stand buffer), 1  $\mu$ l de 1,4-ditiotreitol (DTT, Sigma-aldrich; St Louis MO), 40 U (0.5  $\mu$ l; del inhibidor de RNAsa) y 200U (1  $\mu$ l; RT) la reacción se realizó con un volumen final de 20  $\mu$ L de agua para PCR. Las muestras fueron Incubadas a 55°C durante una hora. Finalmente, la reacción fue inactivada por temperatura a 70°C durante 15 min., el cDNA es almacenado a 4°C hasta su utilización para su amplificación por PCR.

Después de que se ha obtenido la secuencia complementaria (cDNA) a partir del RNA de interés, proseguimos a su amplificación mediante la PCR la cual se describirá en la siguiente sección.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica ampliamente utilizada para la amplificación del DNA en miles de copias del segmento de interés. El proceso utiliza sistemas de oligonucleótidos (DNTP's) y la enzima catalítica termoestable (*Thermophilus aquatica*; Taq DNA polimerasa). La amplificación se realiza mediante la mezcla de reacción la cual contiene el DNA blanco, Taq polimerasa, amortiguador,  $Mg^{+2}$  y nucleótidos (adenina, timina, citocina y guanina) e iniciadores para el segmento específico a amplificar del DNA. La figura 4 muestra las condiciones de cada fase de los ciclos de amplificación, los cuales constan de 1) desnaturalización, lo que permite la apertura de la cadena doble de DNA; 2) alineación, los iniciadores se unen a secuencias complementarias en el DNA; 3) activación de la enzima Taq polimerasa; y 4) extensión de la cadena complementaria.

En la primera fase de amplificación el segmento de DNA de interés produce dos copias y así sucesivamente dando por resultado un aumento exponencial en el número de copias de las secuencias blanco (Flores-Herrera H., y cols. 2008). Aproximadamente se ha estimado que después de 20 ciclos una sola copia de DNA se amplifica más de 2.000.000 de veces [Flores-Herrera 2008].

Las condiciones de PCR fueron: En tubos separados de PCR se agregaron 2  $\mu$ l del cDNA de las diferentes condiciones de infección y se hizo la siguiente mezcla de reacción: 2.5  $\mu$ l Buffer PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4); 500 mM de KCl,  $MgCl_2$  (la cantidad depende del miRNA que voy a amplificar); 1.0  $\mu$ l de mezcla de dNTP (10 mM cada uno); 20 pmol (1.0  $\mu$ l) de iniciadores de cada miRNA (tabla 2) para amplificar (sentido); 1.0  $\mu$ l de primer para amplificar antisentido Stocks de 20 pmol; 0.4  $\mu$ l de Taq polimerasa (2.5 pM) todo a un volumen de 25 $\mu$ l de agua inyectable. Los tubos son introducidos al termociclador a diferentes condiciones de ciclos dependiendo el miRNA, que se quiera amplificar (tabla 2).

#### Visualización del Producto de PCR en geles de agarosa

Las muestras de PCR fueron analizadas en geles de agarosa al 4.0 % con solución amortiguadora de Tris-Borato-EDTA 1x (TBE; BioRad) con 0.4  $\mu$ L de bromuro de etidio. Las condiciones de corrimiento fueron a 50 volts (V) por 40 minutos. Al término de la electroforesis los geles fueron analizados en luz ultravioleta (UV; DNA bio-Imaging System, minibis pro), la imagen fue captada para su análisis.

#### Determinación de la Densidad Óptica de los miRNA

La densidad óptica (DO) de cada banda fue obtenida mediante el programa de ImageJ (NIH, USA). La DO fue expresada en unidades arbitrarias.

## Análisis estadístico

La edad materna, el índice de masa corporal, las concentraciones de la hormona luteinizante y folículo estimulante fueron analizadas mediante la prueba de ANOVA. La diferencia de expresión de los miRNAs entre los grupos fue analizada mediante la prueba de ANOVA seguida del análisis pos-hoc con la prueba de Tukey (SigmaStat version 10.0, USA). Los resultados son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar y se consideró una diferencia estadísticamente significativa menor a 0.05.

## RESULTADOS

### Características clínicas de las pacientes

La tabla 3 muestra las características demográficas de las pacientes con y sin evidencias clínicas de endometriosis. La edad de las pacientes ( $p = 0.268$ ), índice de masa corporal ( $p = 0.392$ ), y los valores de FSH ( $p = 0.275$ ) y LH ( $p = 0.549$ ) tomadas en la fase folicular temprana no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de endometriosis con respecto al grupo control (tabla 3). En las pacientes con endometriosis encontramos dos grados de severidad agrupados en tipo I-II (54.5 %) y III-IV (45.5 %). En cuanto a la intensidad del dolor pélvico, valorado por la escala visual analógica (EVA) encontramos que la intensidad del dolor aumento significativamente, 2.6-veces en las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control ( $p = 0.045$ ; tabla 3). En estos grupos de estudio se encontraron padecimientos agregados como resistencia a la insulina ( $p = 0.32$ ; tabla 3), hipotiroidismo subclínico ( $p \leq 0.001$ ) y síndrome de ovario poliquístico ( $p \leq 0.001$ ).

### Perfil de expresión de los miRNAs

Para determinar el cambio en la expresión de los cuatro miRNAs de las pacientes sanas (control) y de las pacientes con endometriosis que ingresaron a la unidad de biología de la reproducción, se realizó la expresión de los miRNAs mediante la prueba de RT-PCR a punto final. La expresión del miRNA-21, y -200b aumentó significativamente 1.3 ( $p = 0.008$ ; figura 5) y 1.18-veces ( $p = 0.032$ ; figura 7) respectivamente en pacientes con endometriosis comparadas con el grupo control.

El miRNA-141 aumento 1.02-veces en las pacientes con endometriosis, sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p = 0.149$ ; figura 6). Finalmente, el miRNA-210 disminuyó 1.26-veces en las pacientes con evidencias de endometriosis, sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p = 0.073$ ; figura 8).

En las pacientes con diagnóstico de endometriosis y a las cuales se les realizó el procedimiento de fulguración ( $n=5$ ) observamos una disminución significativa de 1.41, 1.10, y 1.10-veces en el miRNA-21 ( $p = 0.002$ ), -141 ( $p = 0.03$ ), y -210 ( $p = 0.009$ ) respectivamente con respecto a las pacientes con endometriosis sin fulguración ( $n=6$ ; tabla 4). En estas 6 pacientes no se realizó fulguración de acuerdo al criterio de cada cirujano, por encontrarse los focos endometriósicos en sitios anatómicos de riesgo para el uso de energía, como vejiga, recto o vasos sanguíneos. Así mismo en las pacientes con fulguración observamos que el miR-200b disminuyó 1.0-veces, sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto a las pacientes con endometriosis sin fulgurar ( $p = 0.369$ ; tabla 4).

## DISCUSIÓN

La endometriosis afecta hasta el 10.0% de las mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por dolor pélvico e infertilidad (3,4,7,8). La cirugía laparoscópica invasiva, sigue siendo el principal método de diagnóstico y tratamiento, sin embargo, debido a los síntomas inespecíficos de la enfermedad, numerosas mujeres sin endometriosis pero con similar presentación son sometidas a esta cirugía. Es por esto que un marcador serológico preciso podría reducir el número de mujeres sometidas de forma innecesaria a este procedimiento y así mismo permitir la posibilidad de un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de la enfermedad.

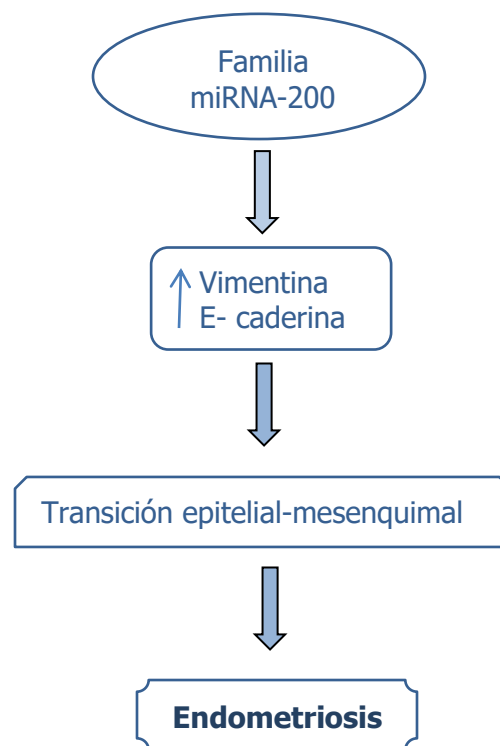
Recientemente, los miRNAs están siendo utilizados como marcadores no invasivos para la determinación de la endometriosis (Yang 2016; Nothnick 2015; Marí-Alexandre 2015; Braza-Boil 2014).

En el presente estudio se evaluó la presencia en la circulación de 4 mi-RNAs como potentes bio-marcadores comparando su expresión entre mujeres con endometriosis y mujeres sin esta enfermedad. Los principales resultados fueron: 1) pacientes con endometriosis los miRNAs-21 (fig. 5) y -200b (fig. 7) aumentaron su expresión con respecto al grupo control y el miRNA-210 (fig. 8) disminuyó su expresión, sin embargo, este último no fue significativamente estadístico; 2) la fulguración redujo significativamente la expresión en los miRNA-21, -141, y -210 con respecto a las pacientes con endometriosis sin fulguración (tabla 4).



De acuerdo con diferentes publicaciones, se han encontrado alteraciones en la expresión de numerosos miRNAs; los miRNA-21 y la familia de los miRNA-200 son los que consistentemente se han encontrado elevados en pacientes con cáncer ovárico epitelial comparados con pacientes control, de estos el miRNA-21, miRNA-203 y miRNA-205 son específicos del tipo histológico endometriode (13).

Los datos acumulados indican que los miRNAs están involucrados en el desarrollo de la endometriosis a través de la regulación de la expresión génica específica. La familia de los miRNA-200 regula una red de factores de transcripción implicados en la transición epitelial-mesenquimal (TEM), un proceso propuesto como un evento crucial para el desarrollo de la endometriosis (14). Se ha visto una correlación entre los niveles de la familia miRNA-200 y la expresión de reguladores claves en el proceso de la TEM como la vimentina y la E- cadherina.



**Figura 9.** Rol de los miRNAs 200 en el desarrollo de endometriosis.

Filigheddu y colaboradores (15) determinaron la expresión diferencial de 50 miRNAs en biopsias de endometrio eutópico y encontraron el incremento del miRNA-21. Sin embargo, la expresión aumentada del miRNA 21 se ha visto mayormente asociada con malignidades, dando una fuerte noción en su función como tumor supresor ya que la restauración a sus valores normales ha mostrado suprimir el crecimiento del cáncer. El miRNA-21 se ha reportado como el oncomiRs que consistentemente se encuentra elevado en la mayoría de los tumores, sugiriendo la posibilidad que la elevada expresión de este miRNA en pacientes con endometriosis asociada a cáncer de ovario (8) puede reflejar la activación de una vía oncogénica común que contribuya a la patogénesis del cáncer de ovario, sin embargo, la fuente del miRNA-21 permanece desconocida.

Finalmente en este estudio también se observó que las pacientes con endometriosis y a las cuales se les realizó fulguración de focos endometriósicos, la expresión de los miRNA-21, -141 y -210 disminuía significativamente (1.41, 1.10, y 1.10-veces, respectivamente) con respecto a las pacientes con endometriosis sin fulguración (tabla 4). Sin embargo, el exacto origen de estos cambios en la circulación no está claro. Aunque alguna evidencia sugiere que los miRNA pueden ser liberados de los tejidos hacia la circulación; se han reportado discrepancias en la expresión de los micro RNA en la sangre y el tejido (3,6), indicando que el tejido enfermo no es la única fuente de los miRNAs circulantes.

## **CONCLUSIÓN**

Los micro RNA juegan un papel importante en la regulación de varios eventos como inflamación, apoptosis, diferenciación y respuesta inmune. La precisa regulación de la expresión de estos genes es fundamental para una función endometrial normal; además los miRNAs en general, son más estables en la circulación comparados con la mayoría de las proteínas, pudiendo ser utilizados como un método diagnóstico confiable y preciso.

En el presente estudio hemos identificado la expresión de dos miRNAs (21 y 200b) que distingue a pacientes con endometriosis y pacientes sin esta enfermedad, lo que sugiere que los miRNAs circulantes pueden servir como prometedores biomarcadores para la detección temprana de la endometriosis.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Aitana Braza-Boils, Josep Marí-Alexandre, et al. Micro RNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Human Reproduction* 2014;29: 978-988.
2. Xian-Jie Tan, Ph.D., Jing-He Lang, M.D, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility* 2002; vol. 78-No.1.
3. SiHyun Cho, M.D., Levent Mutlu, M.D., et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertility and Sterility* 2015; vol. 103-No.5.
4. Lu Yang, Hai Y. Liu. Small RNA molecules in endometriosis: pathogenesis and therapeutic aspects. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2014;183: 83-88.
5. Josep Marí-Alexandre, Javier García-Oms, et al. microRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thrombosis Research* 2015; S38-S40.
6. Kadri Rekker, M.Sc, Merli Saare, et al. Circulating miR-200 family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertility and Sterility* 2015.
7. Warren B. Nothnick, PhD, Ayman Al-Hendy, MD, et al. Circulating Micro-RNAs as diagnostic biomarkers for endometriosis: privation and promise. *The Journal of Minimally Invasive Gynecology* 2015; Vol.22-No.5.
8. Ohlsson Teague EM, Vander Hoek MB, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol.* 2009;23: 265–275.
9. Zheng B, Xue X, Zhao Y, et al. The differential expression of microRNA-143, 145 in endometriosis. *Iran J Reprod Med.* 2014;12: 555–560.

10. Kan CW, Hahn MA, Gard GB, Maidens J, Huh JY, Marsh DJ, et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12: 627.
11. Li A, Omura N, Hong SM, Vincent A, Walter K, Griffith M, et al. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res* 2010;70: 5226–37.
12. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 2011;6:e17745.
13. Swati Suryawanshi, Anda M. Vland, et al. Plasm Micro-RNAs as Novel Biomarkers for endometriosis and Endometriosis-Associated Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Reserch* 2013; 19(5).
14. S. Matsuzaki, C. Darcha, E. Maleysson, M. Canis, G. Mage, et al. Epithelial-mesenchymal transition might be microenvironment-dependent during the evolution of endometriotic implants. *Fertility and Sterility* 2010;94:S201.
15. Filigheddu N<sup>1</sup>, Gregnanin I, et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol* 2010;10:1155.

## TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1. Secuencia de los cuatro miRNAs para RT.**

miRNA	Secuencia 5' a 3'
21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACG ACACA ACT
141	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACG ACCCATCT
200b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTC ATCA
210	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTC AGCC

Retrotranscriptasa (RT)

**Tabla 2. Secuencia de los cuatro miRNAs para la amplificación por PCR.**

miRNA	Secuencia 5' a 3'	Pb
21	CCGGCCGATCGAATAG	71
141	CGGCCGTAACACTGTCTG	75
200b	CGGCCGTAATACTGCCTGG	74
210	CGGCCGCTGTGCGTGT	72

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

**Tabla 3 Características clínicas de las pacientes estudiadas con y sin endometriosis.**

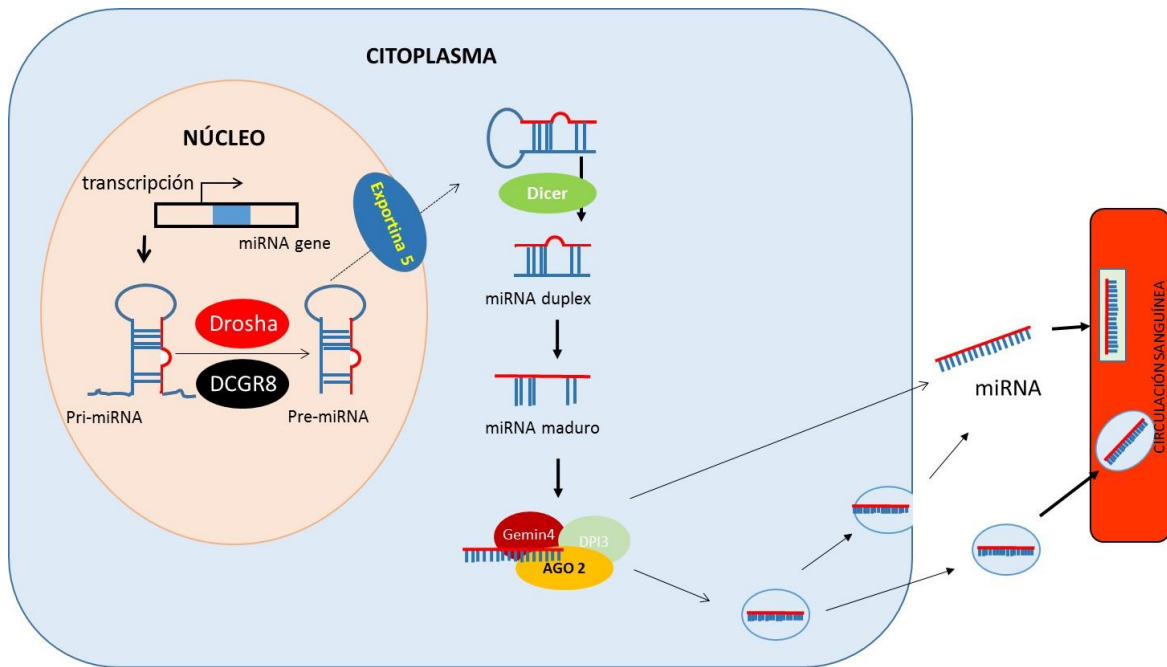
VARIABLE	ENDOMETRIOSIS (n=11)	CONTROL (n=10)	P
Edad (años)	30.1 ± 4.8	32.3 ± 4.2	0.268
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26.5 ± 3.4	25.3 ± 2.6	0.392
Tabaquismo (%)	0	2 (20%)	≤ 0.001
Intensidad del dolor (EVA)	4.45 ± 3.6	1.7 ± 2.1	0.045
Grado endometriosis (rASRM stage)			
I-II (n; %)	6 (54.5 %)	N.A	
III-IV (n)	5 (45.5 %)	N.A	
FSH (mU/ml)	5.8 ± 4.8	5.8 ± 3.2	0.275
LH (mU/ml)	3.8 ± 3.4	2.7 ± 1.2	0.549
Padecimientos agregados			
RI n (%)	3 (27.2 %)	2 (20.0 %)	0.32
HSC n (%)	6 (54.5 %)	3 (30.0 %)	≤0.001
SOP n (%)	0	4 (40.0 %)	≤0.001

Índice de masa corporal (IMC); escala visual análoga (EVA), revisión sociedad americana de medicina reproductiva (rASRM); hormona folículo estimulante (FSH); hormona luteinizante (LH); resistencia a la insulina (RI); hipotiroidismo subclínico (HSC); síndrome de ovario poliquístico (SOP). Porcentajes se determinó mediante la prueba estadística de  $\chi^2$

**Tabla 4. Pacientes con endometriosis con realización de fulguración de focos de endometriosis y sin realización de fulguración a lesiones.**

miRNA	Fulguración (n= 5)	No fulguración (n= 6)	P
<b>-21</b>	63.5 ± 11.7	89.5 ± 9.0	0.002
<b>-141</b>	174.6 ± 9.9	186.6 ± 5.2	0.03
<b>-200b</b>	97.4 ± 6.5	101.0 ± 6.0	0.369
<b>-210</b>	99.0 ± 7.1	109.0 ± 2.5	0.009

FIGURA 1



**Figura 1 Biogénesis y maduración de los miRNAs.** El proceso se inicia en el núcleo al activarse las secuencias genéticas del miRNA activado mediante la RNAsa polimerasa de tipo II (transcripción) generando el transcrito primario (pri-miRNAs) el cual es procesado por el complejo de Drosha y (RNAsa III) y la proteína DGCR8 (DiGeorge syndrome critical región gene 8) y forman un complejo llamado microprocesador como se muestra. La RNAsa III (Drosha) a través de su dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD) reconoce al sustrato del pri-miRNA, y mediante sus dominios de RNAsa III (RIIIds a-b) escinden las cadenas laterales del pri-miRNA para formar un pre-miRNA. Posteriormente, la exportina 5 junto con el cofactor RAN transportan los pre-miRNA del núcleo al citoplasma. En el citoplasma, la RNAsa de tipo III (Dicer) procesa al pre-miRNA generando al miRNA dúplex de aproximadamente 22 pares de bases. Posteriormente el miRNA dúplex es reconocido por secuencias del complejo de argonauta tipo 2 (AGO2) los cuales concluyen con las ediciones dando lugar al miRNA maduro el cual regulará diversas señales en la misma célula o en células vecinas o incluso ser transportadas a otros sitios mediante la circulación sanguínea. Cuando Dicer ha generado a la molécula de miRNA madura este permanece unido y posteriormente es liberado por una helicasa.

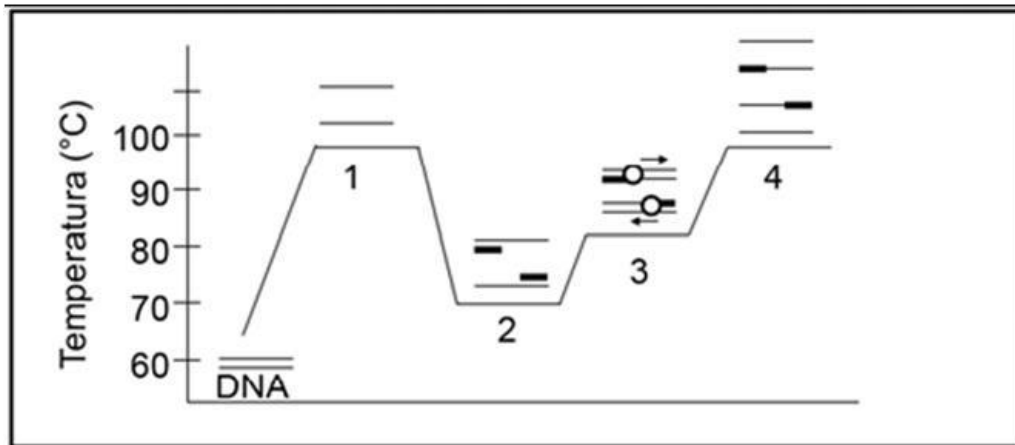


**FIGURA 3**



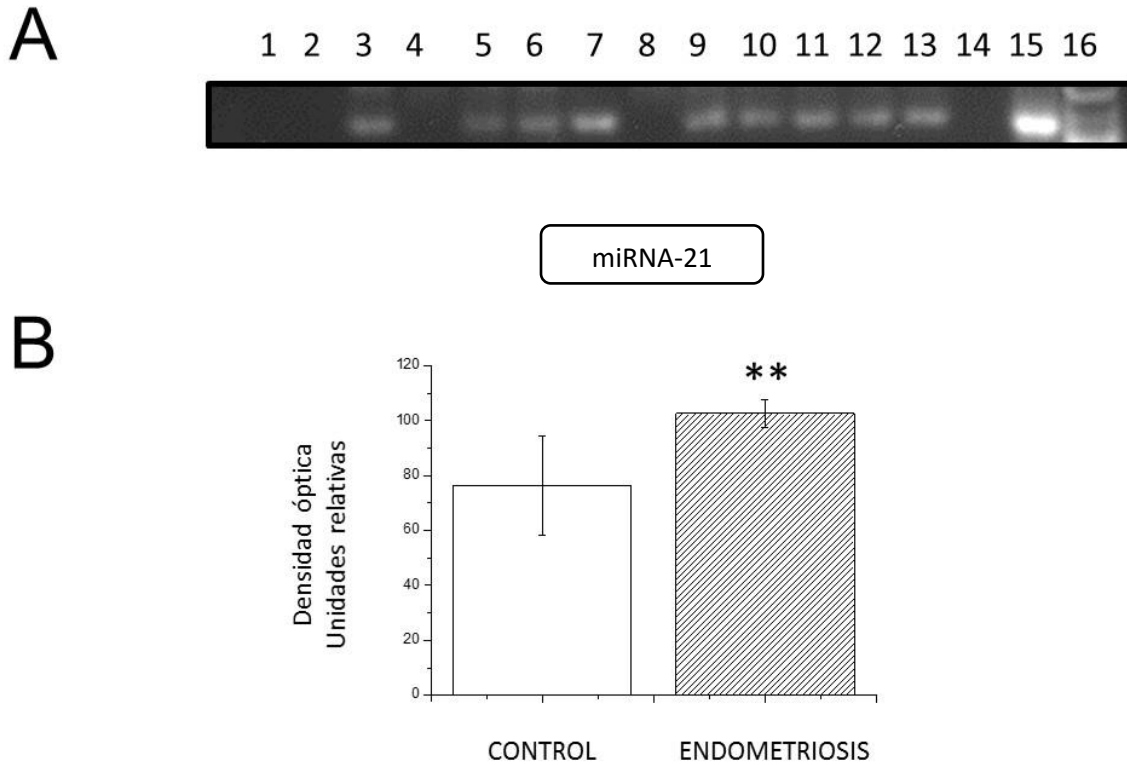
**Figura 3 Obtención del RNAs total.** Formación de las tres fases por el reactivo de TRizol. El cloroformo permite la extracción en tanto que el isopropanol presipita el RNA a partir de la fase acuosa. Las fases que se forman dependen del grado de densidad. La fase superior acuosa (cloroformo-RNA), interfase (fenol-DNA) y la fase inferior orgánica (proteínas y lípidos).

FIGURA 4



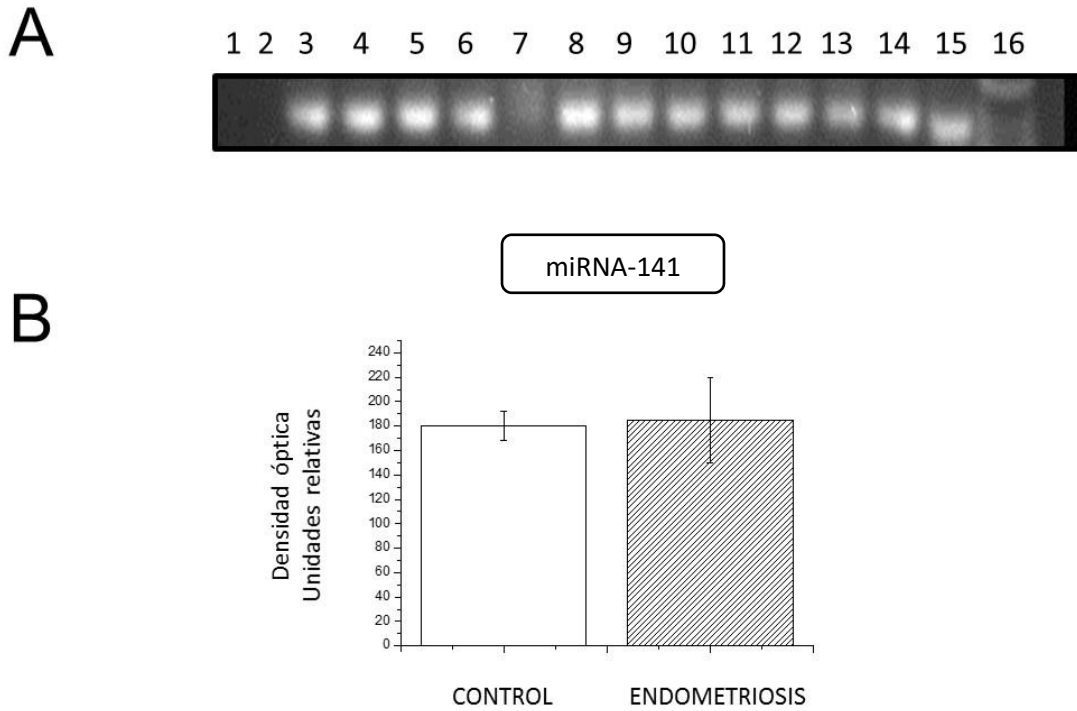
**Figura 4. Amplificación del DNA por la PCR.** El DNA de interés es desnaturalizado (95°C) permitiendo la **separación** de la doble cadena (1); la disminución de la temperatura, permite que el iniciador se **alineee** y se una a las regiones específicas del DNA (2); un segundo incremento de la temperatura (72°C) activa a la polimerasa y comienza la **extensión** de la cadena de DNA, mediante la incorporación de los nucleótidos de adenina, citosina, timina, y guanina (3). El ciclo inicia nuevamente (4). La amplificación de DNA es exponencial con respecto a la concentración inicial (Figura tomada de Flores-Herrera H. y cols. 2009).

FIGURA 5



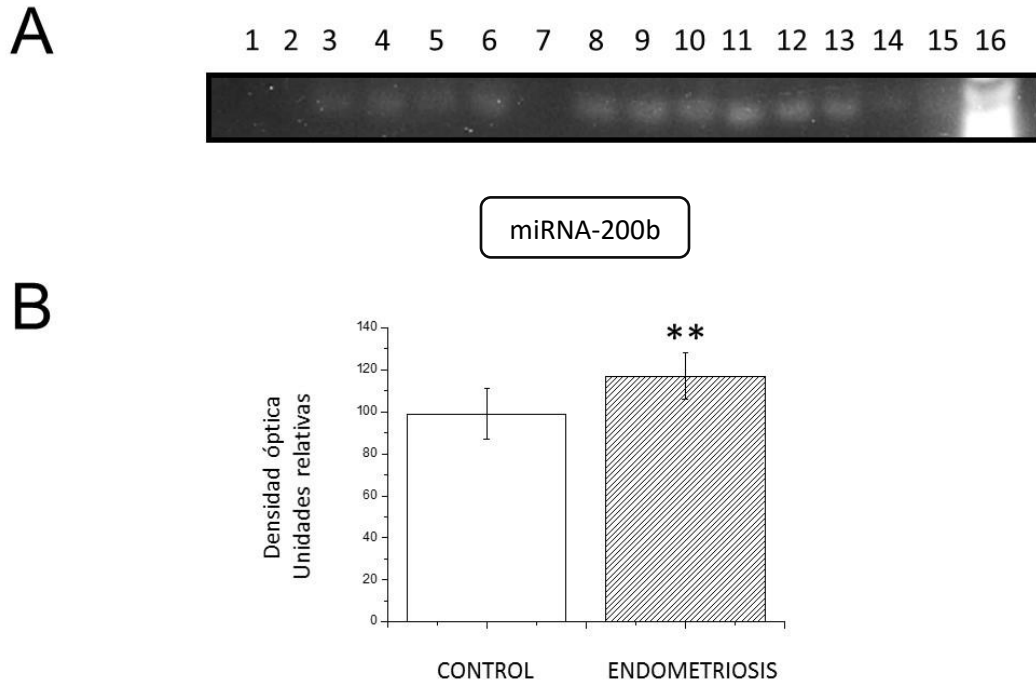
**Figura 5 Expresión de PCR Del miRNA-21.** Se muestra la expresión diferencial ente el grupo de pacientes sanas (Control), y con desarrollo de endometriosis (A). La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con desarrollo de endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La grafica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión (B). Se indica la diferencia estadísticamente significativa  $**p=0.008$ .

FIGURA 6



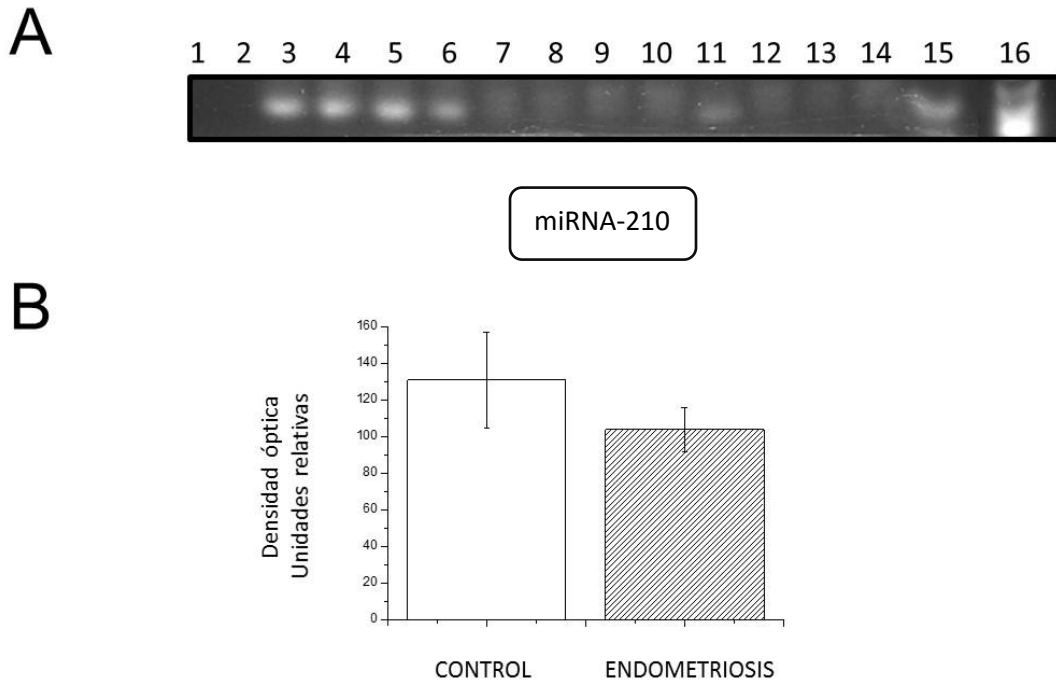
**Figura 6 Expresión de PCR Del miRNA-141.** Se muestra la expresión diferencial ente el grupo de pacientes sanas (Control), y con desarrollo de endometriosis (A). La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con desarrollo de endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La grafica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión (B). No se encontró diferencia estadísticamente entre ambos grupos  $p = 0.149$ .

FIGURA 7



**Figura 7 Expresión de PCR Del miRNA-200b.** Se muestra la expresión diferencial ente el grupo de pacientes sanas (Control), y con desarrollo de endometriosis (A). La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con desarrollo de endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La grafica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión (B). Se indica la diferencia estadísticamente significativa  $**p=0.032$ .

FIGURA 8



**Figura 8 Expresión de PCR Del miRNA-210.** Se muestra la expresión diferencial ente el grupo de pacientes sanas (Control), y con desarrollo de endometriosis (A). La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con desarrollo de endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La grafica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión (B). Se indica la diferencia estadísticamente significativa  $p=0.073$ .