



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

ENTIDAD: INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

CAMPO DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS MÉDICAS

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE MIRNAS EMBRIONARIOS IMPLICADOS EN  
EL PROCESO DE IMPLANTACIÓN**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

**RICADO JOSUÉ ACUÑA GONZÁLEZ**

DIRECTOR DE TESIS

M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

Ciudad de México, octubre 2017



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.

## AUTORIZACIÓN DE TESIS

TÍTULO DE LA TESIS Perfil de expresión de cuatro miRNAs embrionarios implicados en el proceso de implantación.

---

M. en C. Héctor Flores Herrera

Director de Tesis

---

Dr. Ricardo Figueroa Damián

Responsable de la entidad

## ÍNDICE

	<i>Página</i>
<b>ABREVIACIONES</b> .....	7
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	8
<b>APOYOS Y RECONOCIMIENTOS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
 <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>Tabla 1.</b> El universo delRNA .....	20
<b>Tabla 2.</b> miRNAs con mayor expresión secretados por el embrión humano en desarrollo .....	33
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los iniciadores específicos para RT de los miRNAs embrionarios humanos .....	42
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de los iniciadores específicos para PCR de los miRNAs embrionarios humanos .....	43
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de MgSO <sub>4</sub> y de temperatura de alineamiento para los miRNAs del medio de cultivo de embriones humanos .....	46
 <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>Figura 1</b> Factores endometriales y embrionario asociados con la venta de implantación .....	12
<b>Figura 2</b> Tipos de RNA clásicos y los no codificantes .....	18
<b>Figura 3</b> Biogénesis y maduración de los miRNAs.....	24

<b>Figura 4</b> Expresión de los pequeños RNA no-codificantes en diferentes estados de desarrollo .....	29
<b>Figura 5</b> Estandarización del miR-21-30 y 24-1-5pembrionario humano del medio de cultivo .....	44
<b>Figura 6</b> Estandarización del miR-191-5p y -372-5pembrionario humano del medio de cultivo .....	45
<b>Figura 7</b> Expresión de los miRNAs en el medio de cultivo de los embriones humanos con desarrollo tipo II .....	47
<b>Figura 8</b> Expresión diferencial del miR-191-5p y del miR-24-1-5p en el medio de cultivo de los embriones humanos con desarrollo tipo II .....	50
<b>1.0 INTRODUCCION</b> .....	11
<b>2.0 ANTECEDENTES</b> .....	12
2.1 Receptividad uterina.....	12
2.2 Análisis de expresión de genes asociados a la receptividad uterina.....	15
2.3 La herramienta ERA ( <i>endometrial receptivity array</i> ).....	16
2.4 Tipos de RNA.....	18
2.5 Los microRNAs .....	22
2.6 Biogénesis de los miRNAs .....	23
2.7 Función de los miRNAs.....	25
2.8 Caracterización funcional de los miRNAs .....	26
2.9 Los miRNAs como biomarcadores .....	27

	<i>Página</i>
2.10 Los miRNAs embrionario .....	29
2.10.1 miR-21-3p .....	34
2.10.2 miR-24-5p .....	34
2.10.3 miR-191 .....	34
2.10.4 miR-372 .....	36
<b>3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>5.0 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>6.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	
6.1 Objetivo general.....	38
6.2 Objetivos particulares.....	38
6.3 Hipótesis.....	38
<b>7.0 MATERIAL Y METODOS</b>	
7.1 Características de la población de estudio .....	39
Criterios de inclusión .....	39
Criterios de no inclusión .....	39

	<i>Página</i>
Criterios de exclusión .....	40
7.1.1 Estimulación hormonal de las pacientes .....	40
7.1.2 Extracción del RNA total a partir del medio de cultivo de los embriones humanos en desarrollo .....	41
7.1.3 Reacción de retro-transcripción .....	41
7.1.4 Reacción de amplificación por PCR .....	42
7.4 Análisis estadístico.....	43
 <b>8.0 RESULTADOS</b>	
8.1 Expresión de PCR a punto final de los miRNAs procedentes del medio de cultivo de los embriones humanos en desarrollo .....	44
8.2 Expresión de los miRNAs en las pacientes embarazadas no embarazadas .....	46
 <b>9.0 DISCUSIÓN</b> .....	49
 <b>10.0 PERSPECTIVAS</b> .....	52
 <b>11.0 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	53
 <b>12. PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO</b> .....	60

## ABREVIACIONES

cDNA	<u>A</u> cid <u>o</u> <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleí <u>c</u> o <u>c</u> omplementario
ERA	<u>E</u> ndometrial <u>r</u> eceptivity <u>a</u> rray
miRNA	microRNA
MUC1	<u>M</u> ucin-1 <u>c</u> ell surface associated
nt	<u>N</u> ucleó <u>t</u> ido
PCR	<u>R</u> eacción en <u>c</u> adena de la <u>p</u> olimerasa
RNA	<u>A</u> cido <u>r</u> ibonucleí <u>c</u> o
RT	<u>R</u> etro <u>t</u> rascriptasa
μL	Microlitro
UTR	<u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion (región no traducida)



## **AGRADECIMIENTOS**

### **APOYOS Y RECONOCIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó en el departamento de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” INPerIER bajo la dirección del M. en C. Héctor Flores Herrera. La obtención del medio de cultivo de los embriones humanos y la muestra de las pacientes se realizó en departamento de Biología de la Reproducción del INPerIER.

Ricardo Josué Acuña González alumno del programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM (514220750) fue becario del programa de CONACyT.

## RESUMEN

**Antecedentes:** El criterio no invasivo más utilizado para evaluar el éxito en la transferencia de embriones humanos es su desarrollo morfológico; sin embargo, este criterio no contempla aquellos que realizan arresto celular. Recientemente, se han detectado pequeños RNA no codificantes denominados microRNAs (miRNAs) involucrados con el desarrollo embrionario.

*Objetivo* Analizar la expresión de los miR-21-3p, -24-1-5p, -191-5p, y 372-5p en el medio de cultivo de embriones fertilizados *in vitro*.

**Material y Métodos:** Se recuperó el medio de cultivo de los embriones en el día 5 de desarrollo de pacientes embarazadas (n=25) y no embarazadas (n=25). Se aisló el RNA total mediante el reactivo de TRIzol. La expresión de los miRNAs se evaluó mediante la RT-PCR de punto final con iniciadores específicos. Las bandas de expresión fueron cuantificadas mediante densidad óptica. La expresión de los miRNAs es presentada como la media  $\pm$  desviación estándar y el análisis se realizó mediante la prueba de t de Student las diferencias de expresión fueron significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05.

**Resultados:** Al evaluar el perfil de expresión del medio de cultivo de los embriones humanos de las pacientes embarazadas se encontró que el miR-191-5p aumento significativamente 5.2-veces con respecto a las no-embarazadas ( $p \leq 0.001$ ). En tanto que el miR-24-1-5p aumento significativamente 1.6-veces en las pacientes no-embarazadas con respecto a las embarazadas ( $p = 0.043$ ). Finalmente, no se observaron diferencias significativas en los miR-21-3p ( $p = 0.38$ ) y 372-5p ( $p = 0.41$ ) entre ambos medios de cultivo.

**Discusión:** Nuestros resultados sugieren que el miR-191-5p podría ser utilizado como un posible biomarcador de desarrollo embrionario, el cual tiene como blancos moleculares los RNA mensajeros de las proteínas IGF2BP-1 e IGF2R involucradas con la ventana de implantación. En tanto que el miR-24-1-5p podría estar relacionado con malos pronósticos de desarrollo embrionario.

**Palabras clave:** expresión de miRNAs, desarrollo embrionario, implantación.

## ABSTRACT

**Background:** Morphologic features are the most commonly used criteria for embryo selection and subsequent transfer; however, such characteristics are not valid for those in cellular arrest.

**Objective:** Quantify the expression of miR-21, -24, -191, and 372 in IVF embryo culture media.

**Material and Methods:** Day 3 embryo culture media was collected from pregnant patients (n=25) and non pregnant patients (n=25). RNA was isolated using TRizol method. miRNA expression was detected through RT-PCR with specific primers. Expression bands were quantified using optic density. miRNA expression is presented as mean  $\pm$  Standard Deviation and analysis was made with a T-student test, with significative differences smaller than 0.05.

**Results:**By evaluating expression profiles from pregnant patients we found miR-191-5p significantly increased by 5.2 fold compared to non pregnant patients ( $p \leq 0.001$ ). On the other hand, miR-24-1-5p significantly increased in non pregnant patients, compared to pregnant patients ( $p = 0.043$ ). Finally, we have not found any statistically significant difference regarding miR-21-3p and 372-5p ( $p = 0.41$ ) when comparing both culture media.

**Discussion:**Our results suggest miR-191-5p could be proposed as a posible biomarker of adequate embryo development, which is associated with targets IGF2BP-1 and IGF2R involved with implantation window. On the other side miR-24-1-5p could be related to bad embryo development prognosis.

**Keywords:** miRna's expression, embryo development, implantation.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad consisten en la estimulación ovárica controlada para la producción de múltiples ovocitos maduros, la posterior captura de estos y su fertilización *in vitro* para generar embriones los cuales se mantendrán en medios de cultivo específicos donde alcanzarán diferentes etapas de desarrollo como son escisión (3 días) o de blastocisto (5-6 días) y su posterior transferencia a la cavidad uterina, donde algunos se implantarán en el endometrio receptivo lográndose el embarazo. Esta última fase de las técnicas de reproducción asistida es la menos conocida desde el punto de vista fisiológico y fisiopatológico.<sup>1</sup>

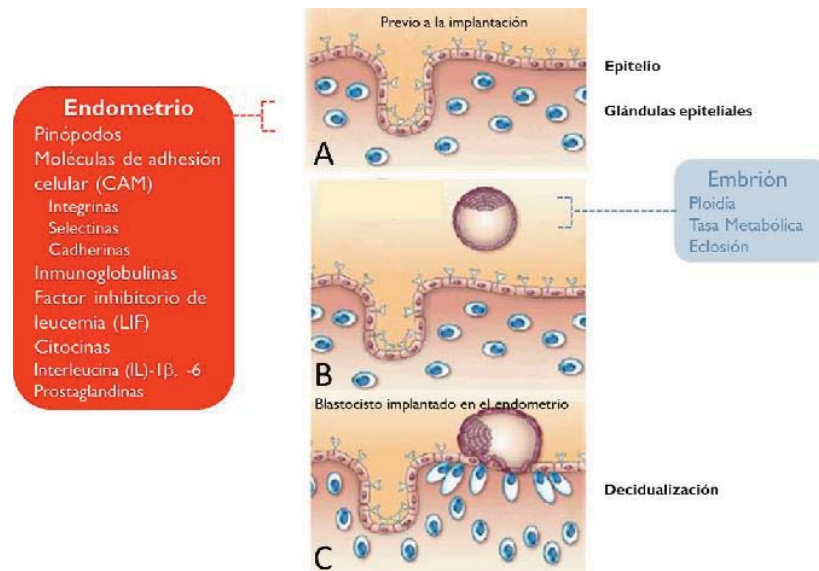
La tasa de implantación embrionaria se define como el número de sacos gestacionales observados ultrasonográficamente en la semana 6 del embarazo divididos entre el número de embriones transferidos. A nivel mundial la tasa de implantación se encuentra en 30-40%.<sup>2</sup> En el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México, se ha reportado en los últimos cinco años la tasa de implantación del 25%.

Estas cifras denotan la baja eficiencia de los métodos actuales tanto para seleccionar a los mejores embriones, como en la determinación de la ventana endometrial de implantación. Recientemente, se han descrito la expresión de RNA no-codificantes involucrados con el desarrollo y diferenciación en diferentes tipos celulares. En el presente estudio, se evaluó el perfil de expresión de cuatro miRNAs embrionarios asociados al proceso de implantación en pacientes que acudieron al programa de fertilización *in vitro*.

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 Receptividad uterina

El concepto de receptividad uterina se refiere a la capacidad del endometrio para permitir la implantación embrionaria en desarrollo el cual ocurre mediante complejas interacciones divididas en 3 etapas: aposición, adhesión, e invasión(fig. 1).



**Figura 1 Factores endometriales y embrionarios asociados con la ventana de implantación.** Previo a la implantación se favorecen en el endometrio el desarrollo de proyecciones en el epitelio celular (pinópodos)<sup>3</sup>, aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular ( $\alpha\beta3$  integrina, e-cadherina)<sup>4</sup>, y moléculas asociadas con la respuesta inflamatoria<sup>5</sup> (A). Se ha demostrado que la tasa de implantación embrionaria es mayor en embriones euploides, se aumenta la tasa metabólica (B) lo que favorece su adhesión e invasividad en el epitelio endometrial(C). La figura fue tomada de Koot y colaboradores (2012)<sup>6</sup> con modificaciones personales.

Durante aposición, el blastocisto cesa su migración, permanece estático y las células del trofoectodermo se unen al epitelio endometrial receptivo, el blastocisto posteriormente realiza el proceso de adhesión, anclándose a la

lámina basal y la matriz estromal extracelular, en este punto la unión endometrio-embionaria no puede ser destruida mediante lavado uterino; por último se lleva a cabo la invasión, el proceso que involucra la penetración del blastocisto en el epitelio luminal.<sup>7</sup>

El proceso de receptividad uterina e implantación se presenta durante una ventana reducida de tiempo, descrito por primera vez en modelos experimentales.<sup>1,2</sup> Este hallazgo motivó diversas estrategias para su búsqueda en el humano, determinando que esta ventana de implantación está comprendida entre el 5º y el 6º día después de la ovulación, periodo que coincide con el incremento de progesterona plasmática.<sup>8</sup> En este periodo se ha observado en la superficie de las células endometriales la disminución en el grosor de las glicoproteínas de membrana, y en su carga electrostática<sup>9</sup>,<sup>10</sup> así como cambios morfológicos en las microvellosidades epiteliales generando grandes áreas aplanadas en la superficie.<sup>11, 12</sup>

Se ha reportado la biosíntesis de proteínas de superficie de tipo integrinas localizadas principalmente en el dominio apical (fig. 1A)<sup>13-15</sup> y basolateral<sup>16-19</sup> además de moléculas como los ligandos de selectina, que contribuyen a la adhesión del trofoectodermo al epitelio endometrial, mientras que el trofoectodermo humano expresa L-Selectina, estableciendo un sistema altamente coordinado entre ligando-receptor.<sup>20</sup> Otras moléculas involucradas son el heparán sulfato,<sup>21, 22</sup> la proteína MUC1 (por sus siglas en inglés, mucin-1 cell surface associated)<sup>23, 24</sup> y las integrinas  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  y  $\alpha 5 \beta$ , involucradas en estadios tempranos de la ventana de implantación.<sup>25-28</sup>

La expresión espacio-temporal de miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF; epidermal growth factor, por sus siglas en inglés) y sus receptores (ErbBs) en el embrión y el endometrio durante el periodo preimplantación, sugieren que estos factores de crecimiento podrían estar regulando una interacción entre ellos.<sup>29</sup> Algunos de los miembros de esta familia expresados durante la ventana de implantación son el propio EGF, el factor Transformante de Crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ), EGF de unión a heparina (HB-EGF) anfiregulina (Ar),  $\beta$ -celulina (BTC) epiregulina (Er) y herregulina (HRG).<sup>30</sup> HB-EGF se expresa durante la ventana de implantación y también

estimula el desarrollo de embriones humanos generados mediante ciclos de fertilización *in vitro*.<sup>31</sup>

La expresión del factor inhibidor de leucemia (LIF; por sus siglas en inglés, leukemia inhibitor factor) incrementa justo antes de la implantación en las glándulas endometriales y luminal<sup>32, 33</sup> y se ha propuesto como una molécula que estimula la implantación del blastocisto,<sup>32</sup> mediante vías moleculares que inhiben la diferenciación pero promueven la proliferación de las células madre embrionarias en la masa celular interna, los mecanismos conocidos del LIF en el proceso de implantación son el incremento en la expresión de EGF y otros genes de receptividad endometrial, así mismo, LIF promueve la decidualización incrementando la producción de citocinas y prostaglandinas, LIF también está involucrado en la potenciación de la interacción embrión-endometrio a través de pinópodos y moléculas de adhesión. Finalmente, LIF está involucrado en el reclutamiento de leucocitos específicos que participan en la respuesta inflamatoria durante la implantación.<sup>34</sup>

Se han desarrollado modelos experimentales que bloquean la acción del LIF, lo cual ocasiona invariablemente fallo en la implantación.<sup>35</sup>

Mediante el uso de microscopía electrónica, se ha revelado la aparición cíclica de estructuras que protruyen del polo apical de las células epiteliales durante la fase secretora media denominados pinópodos.<sup>36</sup> Estas podrían ser la primera estructura que contacta con el embrión. Existe evidencia experimental que demuestra la adhesión de blastocistos a células endometriales que despliegan estructuras semejantes a pinópodo.<sup>18</sup> Los pinópodos son grandes protuberancias ectoplásmicas de aspecto esponjoso que aparecen en la membrana apical de células endometriales secretorias durante el periodo de receptividad, sustituyendo a las microvellosidades.<sup>37</sup> Estas estructuras están relacionadas con el transporte apico-basal de fluidos y macromoléculas hacia el estroma, los pinópodos reciben su nombre debido a esta actividad pinocítica.<sup>38</sup>

## *2.2 Análisis de expresión de genes asociados a la receptividad uterina*

Con el desarrollo del análisis genómico funcional, se ha logrado identificar perfiles de expresión génica bajo distintas condiciones de receptividad o embarazo, utilizando tecnología de microarreglos.<sup>39</sup> Con esta técnica es posible medir el nivel de expresión de miles de genes en un conjunto de células, permitiendo descubrir genes o vías probablemente involucradas en un proceso biológico, incluso cuando no existe una pista acerca de su identidad.<sup>40</sup> La evaluación de la expresión génica global ha permitido determinar perfiles de expresión de cada fase endometrial durante el ciclo menstrual.<sup>41-44</sup> Para este propósito, se han tomado biopsias endometriales de voluntarias sanas, en el tercer día posterior a la identificación del pico de hormona luteinizante, (fase lútea temprana: LH+3) o en día LH+8 (fase lútea media, durante la apertura de la denominada “ventana de implantación”). Posteriormente se extrae el RNA y se evalúa la expresión génica mediante tecnología de microarreglos, utilizando un abordaje bioinformático.<sup>37</sup>

Dado que la adquisición de receptividad endometrial está fundamentalmente dirigida por la progesterona,<sup>45, 46</sup> se han determinado patrones de expresión génica durante los ciclos menstruales espontáneos comparando perfiles de expresión endometrial en distintos niveles de progesterona sérica: bajos niveles de progesterona hacia los días 8-11, (fase proliferativa)<sup>41, 47</sup>, niveles medios en los días 15-17 del ciclo menstrual<sup>42, 44, 48, 49</sup> y con niveles pico de progesterona (días 19-23, ventana de implantación).

Los patrones de expresión descritos en fase proliferativa difieren significativamente de la expresión durante la ventana de implantación, dentro de los genes con elevación importante en la expresión con respecto a la fase proliferativa se encuentran proteínas involucradas en el transporte y señalización del colesterol como M12529 que codifica ApoE y se expresa 100 veces más durante la ventana de implantación, J02611 que codifica ApoD, genes relacionados con la biosíntesis de prostaglandinas, como PLA2, (fosfolipasa A2) y el receptor de PGE2 (prostaglandina E2). Además de genes relacionados con el metabolismo de hidratos de carbono como glucoroniltransferasa I, y GlcNAc6ST (N-Acetilglucosamina-6-O-



sulfotransferasa) y genes involucrados con proteínas secretadas como glicodelina (globulina endometrial alfa-2 asociada con el embarazo) mamaglobina, Dickkopf-1 (hdkk-1) y la proteína de unión a factor de crecimiento insulinoide 2 (IGFBP-2).<sup>50</sup>

Los estudios de microarreglos han determinado expresión diferencial en al menos 63 transcritos entre mujeres con falla en la implantación comparadas con mujeres que lograron embarazo,<sup>51</sup> de los cuales se pudieron identificar 14 genes coincidentes con los reportados en otros estudios,<sup>52, 53</sup> y al menos 4 de ellos están relacionadas con la regulación del sistema inmunológica. De estos 14 genes, cinco están también disminuidos en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis,<sup>41, 48</sup> estos 5 genes son los siguientes: la proteína alfa de unión al componente 4 del complemento, (C4BPA), glicodelina, proteína activadora de RAP1 GTPasa, (RAP1GA1), receptor de endotelina Tipo B, (EDNRB) y ankirina 3, (ANK3). El aumento en la expresión de dichos genes tiene relevancia clínica ya que las tasas de implantación de pacientes con endometriosis son menores en pacientes con esta patología que ingresan a protocolos de reproducción asistida, lo cual se ha atribuido típicamente a alteraciones embrionarias secundarias a daño ovocitario, sin embargo estas alteraciones en el endometrio eutópico demuestran que también podría estar implicado en la disminución de la tasa de implantación.<sup>54</sup>

Recientemente se ha descrito una herramienta genómica que determina un microarreglo en conjunto con un predictor bioinformático para predecir ventana de implantación. Esta herramienta se denomina ERA (Endometrial Receptivity Array; por sus siglas en inglés).<sup>55</sup>

### *2.3 La herramienta ERA (endometrial receptivity array)*

Con la llegada de la tecnología de microarreglos, el número de posibles blancos moleculares en la receptividad endometrial se ha incrementado sustancialmente, y la genómica funcional de la receptividad endometrial se ha investigado ampliamente desde la década pasada, tanto en ciclos estimulados, como naturales.<sup>40</sup>

De acuerdo con la información obtenida acerca del aumento o disminución de los genes involucrados en la ventana de implantación, Ruíz-Alonso y colaboradores (2013) desarrollaron una herramienta diagnóstica que puede identificar un endometrio receptivo con el uso de una marca transcriptómica específica presente en ciclos tanto naturales como con reemplazo hormonal.<sup>55</sup> El arreglo de receptividad endometrial consiste de un arreglo de 238 genes expresados en distintas etapas del ciclo endometrial y está acoplado con un predictor computarizado que es capaz de identificar el estatus de receptividad de una muestra endometrial y diagnosticar la ventana de implantación personalizada de la paciente independientemente del aspecto histológico de la muestra.<sup>56</sup>

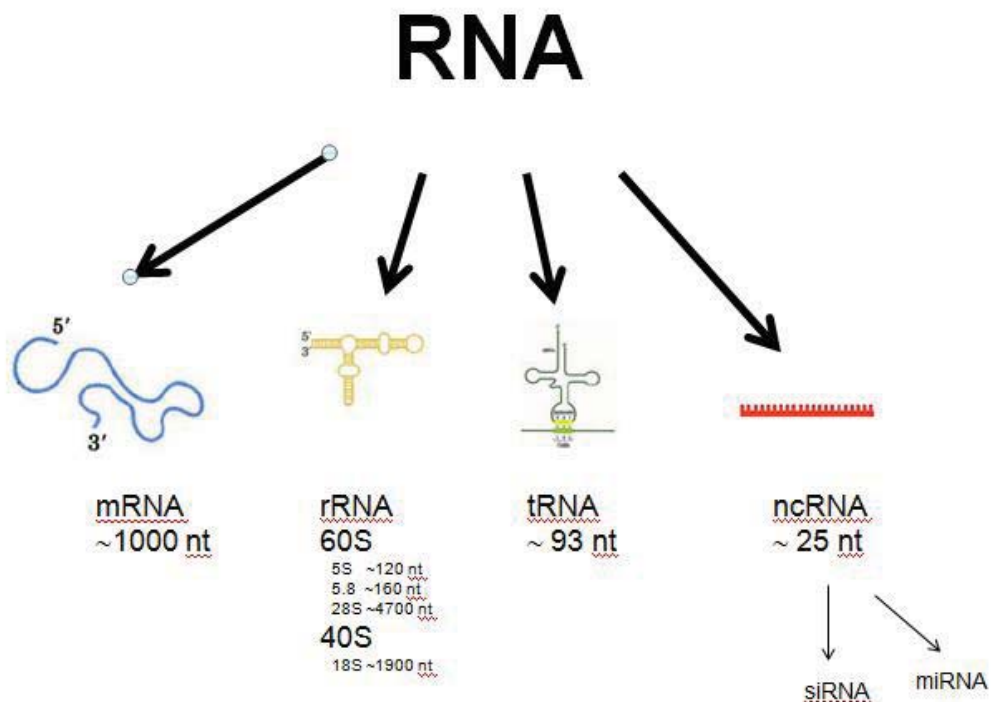
La precisión de la prueba ERA es superior a la histología endometrial, y los resultados son reproducibles en los mismos pacientes incluso 29-40 meses después de la primera evaluación, la concordancia entre los patólogos que evalúan biopsias de endometrio contra la aparición del pico de LH arrojó valores de 0.618 (0.446-0.791) y 0.685 (0.545-0.824). La variabilidad interobservador entre patólogos mostró un índice Kappa de 0.622 (0.435-0.839). La concordancia del ERA contra la aparición del pico de LH demostró un valor de 0.922 (0.815-1.000). La reproducibilidad del ERA demuestra un 100% de consistencia.<sup>57</sup>

Los autores del ERA seleccionaron los genes basándose en el análisis de distintos perfiles de expresión del genoma completo entre el endometrio receptivo y no receptivo (pre-receptivo) utilizando los datos de expresión cruda obtenidas previamente.<sup>57</sup> Se llevó a cabo un análisis estadístico y aquellos genes que demostraron una diferencia absoluta de 3-veces y una tasa de falsa aparición menor a 0.05 fueron seleccionados. Con los genes seleccionados se construyó un microarreglo denominado ERA. Esta herramienta se ha probado contra biopsias endometriales para determinar la huella de expresión génica característica de la receptividad endometrial.<sup>56</sup> Las muestras para análisis ERA se colectan mediante biopsia endometrial, posteriormente se almacenan en nitrógeno líquido a -80 °C. El RNA obtenido es convertido mediante la transcripción reversa (RT-PCR) a cDNA y posteriormente es amplificado para determinar el estado endometrial y utilizar esta información en un ciclo de transferencia embrionaria posterior.<sup>56</sup>

A pesar de que se han logrado enormes avances en la indentificación de marcadores endometriales que ayuden a determinar la ventana de implantación, poco se sabe sobre los patrones de expresión que se realizan en los embriones y su aplicación en la clínica, por lo tanto es imperativo encontrar biomarcadores moleculares equiparables al estudio ERA relacionados con la calidad embrionaria y su capacidad de implantar en un endometrio receptivo. En este sentido, los microRNA son moléculas prometedoras y se secretan y pueden ser cuantificadas en el medio de cultivo embrionario<sup>53</sup>, además están relacionadas con el desarrollo embrionario desde su descubrimiento hace más de 25 años.<sup>49</sup>

## 2.4 Tipos de RNA

El ácido ribonucleico (RNA) es una molécula de síntesis celular conocida principalmente por su papel en la exportación de información genética desde el núcleo hacia el citoplasma donde normalmente se traduce a proteínas (fig. 2).<sup>58</sup>



**Figura 2. Tipos de RNA clásicos y no-clásicos.** Se muestra la estructura y número de nucleótidos aproximados del RNA clásicos: mensajero (mRNA), ribosomal (rRNA), de transferencia (tRNA) y no-clásicos RNA no codificante (ncRNA) entre los que se encuentra el de interferencia (siRNA) y los microRNAs (miRNAs).

El ácido ribonucleico (RNA) comprende una gran variedad de moléculas con distinta longitud, estructura y funciones. En términos generales los RNA clásicos o codificantes están implicados directamente con la síntesis de proteínas, y estos incluyen 3 subtipos: 1) RNA mensajero, que transporta la información génica desde el núcleo hacia el citoplasma, en un proceso denominado transcripción <sup>59</sup>éstas moléculas miden alrededor de 1000 nt;<sup>60</sup>2)RNA ribosomal que constituye la estructura fundamental de los Ribosomas, (2/3 rRNA y 1/3 proteína) en eucariontes se agrupa en subunidades 60S (Subunidad grande o LSU) y 40S, (Subunidad Pequeña o SSU). La LSU actúa como Ribozima, catalizando la formación de enlaces peptídicos; los ribosomas tienen 3 sitios de unión denominados A, P y E, el sitio A se une a un aminoacil-tRNA, el sitio P contiene el enlace éster del peptidil-tRNA del último aminoácido en la cadena en crecimiento, y el sitio E, que recibe al tRNA que estaba sujeto dentro del último aminoácido.<sup>61</sup> los ribosomas pueden fragmentarse en subunidades S (la S representa unidades Svedberg, una unidad no-métrica del coeficiente de sedimentación, que mide la velocidad a la que una partícula se sedimenta); <sup>62</sup>y 3)RNA de transferencia, una molécula adaptadora de 76-90 nucleótidos que funciona como un vínculo físico entre el mRNA y los aminoácidos.<sup>63</sup>intercambiar tripletes de nucleótidos por el aminoácido correspondiente de acuerdo a la complementariedad de pares de bases con el RNA mensajero, (codón-anticodón)<sup>64</sup> (fig. 3). Recientemente se han descubierto nuevos tipos de RNA, denominado RNA no codificante con estructura, biogénesis y funciones novedosas (tabla 1).

**Tabla 1. El universo delRNA**

Blanco molecular	Nombre	Función celular detallada
Traducción de Proteínas	RNA mensajero (mRNA)	Codifica la información requerida para traducir DNA en proteínas. Pre.mRNA es transcrito a partir del DNA por la RNA Pol II, y el proceso de maduración involucra la remoción de intrones, adición de un capuchón 5' de metilguanisina, y poliadenilación del extremo 3' de la molécula de RNA. El mRNA se exporta hacia el citoplasma y se traduce en proteínas mediante los ribosomas. El código genético se basa en codones, tres nucleótidos consecutivos que identifican aminoácidos consecutivos, y que tomados en forma secuencial, forman una proteína.
	RNA de transferencia (tRNA)	Es responsable de aportar los aminoácidos correspondientes a un codón específico de mRNA al ribosoma. Los tRNAs están formados por: un anticodón (una secuencia 3-nt complementaria al codón de mRNA, un sitio de unión de aminoácidos, y un sitio de unión de la sintasa de aminoacil t-RNA, una enzima que liga los aminoácidos individuales a los tRNAs.
	RNA ribosomal (rRNA)	Es el componente de RNA del Ribosoma, para traducir el mRNA en proteínas, los ribosomas alinean el anticodón de tRNA con el codón de mRNA, y la actividad de peptidiltransferasa liga y une a estos aminoácidos. Los organismos eucariotes poseen cuatro tipos de rRNA: RNA 18s en la subunidad ribosomal menor, y RNA 28s, 5,8s, y 5s en la subunidad ribosomal mayor.
Función Proteica	Molécula de reconocimiento de señal. (7SL RNA o SRP RNA)	Parte de la SRP que une los ribosomas y retrasa la traducción hasta que se asocia al receptor SRP localizado en la membrana celular, una vez unido, se libera el SRP, y el ribosoma continúa la traducción de la proteína y cruza la membrana plasmática.
Función y maduración del RNA	RNA pequeño nuclear (snRNA)	Parte del spliceosoma, un complejo que retira intrones del pre-RNA. Se han descrito cinco tipos de RNA pequeños nucleares (snRNA)
	RNA pequeño nucleolar (snoRNA)	Involucrado en modificaciones de otros RNAs. Existen dos clases principales: snoRNA de caja H/ACA (conversión directa de uridina a pseudouridina), y snoRNA de caja C/D (agregan grupos metilo a los RNAs)
	Ribonucleasa P (RNaseP)	El componente de RNA de una ribozima que escinde y genera el tRNA

		maduro, pero también se requiere para la transcripción de varios genes de RNA no codificantes por la RNA polimerasa III (tRNA, 5s rRNA, SRP RNA, y genes U6snRNA).
	Y RNA	Parte del complejo nucleoproteína RoRNP. El Y RNA podría estar implicado en la resistencia a la radiación UV en la replicación del DNA, se requiere para la gran proliferación de líneas celulares.

*continuación*

**Tabla 1. El universo de los RNA**

Blanco molecular	Nombre	Función celular detallada
Función y maduración del RNA	MRP Ribonucleasa (Rnase MRP)	El componente de RNA de la Rnase MRP, una ribozima esencial para la replicación del DNA mitocondrial. En el núcleo, la Rnase MRP participa en el procesamiento de rRNA precursor.
	RNA circular (circRNAs)	Actúan como “esponjas moleculares”, uniéndose y bloqueando miRNAs.
RNAs reguladores	RNA grande No codificante (lncRNA y pseudogenes de RNA grande)	Transcriptos no codificante de mas de 200 nucleótidos hasta 100 kb de longitud. Funcionan en distintas áreas, incluyendo epigenética, splicing alternativo, e importación nuclear, por ejemplo lncRNA XIST es responsable de la inactivación del cromosoma X.
	RNAs amplificadores (eRNA)	Un tipo de RNA que regula epigenéticamente la función amplificadora de las regiones promotoras, alterando su transcripción.
Síntesis de Telómeros	RNA Telomerasa	Es el componente de RNA del complejo Telomerasa, que extiende los extremos del DNA previniendo su pérdida durante la replicación. El componente proteico de la telomerasa presenta una actividad transcriptasa reversa y el componente RNA sirve como un templado para la repetición del telómero.
RNA de interferencia	microRNA	RNA corto (19-25 nt) típicamente involucrados en la regulación a la baja de la expresión génica.
	RNA pequeño de interferencia, (siRNA)	RNA de doble cadena exógeno, corto (21-23 nt) que regulan la expresión de genes específicos. Posterior a la transfección de siRNAs, se ensambla un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Los siRNAs se desenrollan, y una sola cadena es la que queda unida al complejo RISC, posteriormente el complejo se dirige y escinde transcritos de mRNA que poseen secuencias complementarias al siRNA asociado. Fisiológicamente, los siRNA se generan también después de infecciones por virus RNA.
	RNA de interacción Piwi, (piRNA)	RNAs cortos, que son parte del complejo riboproteico, los cuales aseguran la estabilidad de línea germinal al silenciar transposones dentro de las células germinales. Se encuentran en aglomerados (clusters) que codifican decenas de miles de diferentes piRNAs a lo largo de todo el genoma de los mamíferos.

Sin embargo, recientemente se han descubierto nuevos tipos de RNA, denominado RNA no codificante con funciones novedosas (tabla 1).

### 2.5 Los *microRNAs*

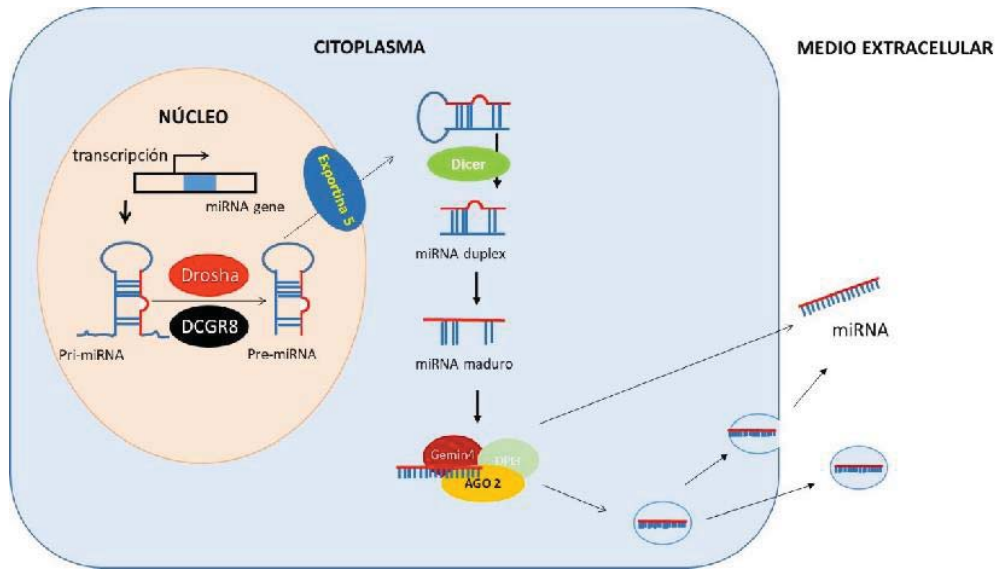
Los *microRNAs* (miRNAs) constituyen una amplia familia de moléculas de RNA no codificante de alrededor de 21 nucleótidos. Estos se descubrieron hace más de 20 años como reguladores post transcripcionales clave de la expresión génica.<sup>66</sup> El papel regulador de estas pequeñas moléculas de RNA ha comenzado a ser explorada en el sistema reproductor humano. Originalmente descubiertos en el nematodo *Caenorabditis elegans*, estas pequeñas moléculas controlan la expresión génica post transcripcional al silenciar la traducción del RNA mensajero o al promover su degradación en el citoplasma.<sup>66</sup> Recientemente se ha demostrado que los miRNAs juegan un papel importante regulando la maduración del ovocito donde se ha demostrado que los ovocitos en Meiosis II presentan aumento en la expresión de cuatro miRNAs, (hsa-miR-193a, -297, -625 y -602) y baja expresión de once miRNAs (hsa-miR-15, -20a, -141\*, -212, -299-5p, -339-5p, -376a, -486-5p, -662, -768-5p, y -888\*). El estudio concluye que existen diversos miRNAs en ovocitos humanos que presentan cambios dinámicos durante la meiosis<sup>67</sup>, foliculogénesis, función del cuerpo lúteo,<sup>68</sup> y se ha determinado que miR-199a-3p, miR-145 y miR-31 incrementan su expresión en el estadio folicular y demuestran una franca disminución en la transición lúteo-folicular, los miRNAs regulan la actividad folicular y lútea modulando múltiples factores, por ejemplo miembros de la superfamilia del factor transformador de crecimiento (TGF- $\beta$ ), cinasas tipo receptor de activina, (ALKs) y proteínas de la familia SMAD (Small Body Size-Mothers Against Decantaplegic).<sup>68</sup> Además, los miRNAs se han asociado con la implantación y desarrollo embrionario temprano.<sup>69</sup> La delección de dos componentes esenciales en la biogénesis de miRNAs: Dicer y su cofactor Dgcr8 (Di George Syndrome Critical Region 8), en ratones conduce al arresto embrionario en día E6.5 y E7.5, poco después de la implantación.<sup>70</sup>

El fenotipo knockout de Dicer desarrolla un epiblasto con gastrulación primaria y expresión del mesodermo temprano, sin embargo la estría primitiva presenta fallo en la elongación y existe pérdida de la expresión de marcadores endodérmicos definitivos como el gen homeótico Hex (Haematopoietically Expressed Homeobox) y Cer1 (Cerberus Like 1).<sup>71</sup>

## *2.6 Biogénesis de los miRNAs*

Los miRNAs se transcriben mediante la RNA polimerasa II y/o RNA polimerasa III como un transcrito largo inicial de 100-1000 nucleótidos, denominado pri-miRNAs, o miRNA primario, el cual está usualmente encapuchado en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. Los pri-miRNAs son procesados secuencialmente mediante las ribonucleasas Droscha y Pasha (DGCR8) para generar un pre-miRNA de 60-70 nucleótidos, el cual tiene un fosfato 5' y un segmento sobresaliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' (fig. 3).<sup>66</sup> Estos productos son posteriormente exportados al citoplasma mediante la exportina-5<sup>72</sup> donde se unen a la ribonucleasa Dicer y son procesados para generar un doble cadena miRNA:miRNA.<sup>73</sup> Por último, se propone que una helicasa (aún no caracterizada) desdobra el dúplex y forma los miRNAs maduros (fig. 3).<sup>62</sup>





**Figura 3 Biogénesis y maduración de los miRNAs.** El proceso se inicia en el núcleo al activarse las secuencias genéticas del miRNA activado mediante la RNA 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 RNAasa 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 argonauto 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. Modificado de Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116:281-297

Estos miRNA's maduros se incorporan al complejo silenciador inducido por RNA (RISC) y se unen a la secuencia complementaria 3'UTR de su blanco de mRNA específico. Esto resulta en la inhibición de la traducción de mRNA o promueve su degradación y conduce al silenciamiento génico post transcripcional, (PTGS).<sup>74</sup> Además, el silenciamiento génico post transcripcional inducido por RNA (RITS) que utiliza Ago1 en lugar de Ago11 en su complejo efector, fue descrito hace más de una década.<sup>75</sup> Dicho complejo ejerce modificaciones DNA/Histona, (por ejemplo metilación) en el genoma y por lo tanto desencadena el silenciamiento génico. Aunque se ha identificado

el RITS en diversas especies, su presencia aún no se ha demostrado en el ser humano. En la mayoría de los casos, la región “semilla” (las 7-8 pares de bases después de la primera o segunda base del extremo 5´del miRNA) complementa de forma perfecta la secuencia blanco de mRNA. El apareamiento de bases de nucleótidos también ocurre en el extremo 3´del miRNA, aunque se cree que es más débil y de menor importancia que el apareamiento 5´. Los desajustes del dúplex miRNA:miRNAs ocasionan la generación de estructuras protuberantes en la región central, lo cual podría ser útil en la regulación de mRNA. Debido a lo pequeño de los elementos de reconocimiento, el mismo miRNA puede reconocer cientos de genes blanco, y así, cada gen puede ser blanco de varios miRNAs.<sup>76</sup>Desafortunadamente, la complejidad combinada de la interacción éstos elementos hace que la comprensión de la biología de los miRNA sea una tarea difícil.

### 2.7 Función de los miRNAs.

Los miRNA se expresan en todos los tejidos y regulan un amplio espectro de procesos, tales como la diferenciación celular, proliferación y apoptosis.<sup>77</sup>Más aún, las funciones de los miRNAs pueden ser muy diferentes unas de otras. Por ejemplo, en el cáncer, varios miRNAs se han caracterizado ampliamente y se han clasificado como reguladores de la oncogénesis (oncomiRs); en contraste, otros se han descrito como supresores de tumores, tales como la familia let-7 que puede dirigirse a oncogenes tales como RAS, MYC, HMGA2, y puntos de revisión del ciclo celular.<sup>78</sup>Existe una tendencia creciente hacia la identificación de miRNAs con fines diagnósticos en biología de la reproducción, aunque la mayoría de los estudios no investigan su papel funcional, solamente consideran predicciones *in silico*. Las patologías estudiadas que son relevantes para la reproducción son la endometriosis,<sup>79</sup>cáncer endometrial,<sup>80</sup> receptividad endometrial,<sup>81</sup>decidualización,<sup>82</sup>preeclampsia,<sup>83</sup>y embarazos ectópicos.<sup>84</sup>

Los miRNAs podrían encontrarse eventualmente en el origen de patologías idiopáticas en biología de la reproducción, pero se requiere investigación básica para dilucidar los efectos específicos que tienen diferentes miRNAs en

los diversos tipos celulares que componen el endometrio. Estas moléculas no sólo están presentes en tejidos sino también en una gran variedad de muestras biológicas, (por ejemplo sangre, suero, plasma, orina y saliva). Dado el pequeño tamaño de los miRNAs, se deben emplear métodos de extracción específica de RNA para asegurar su obtención, lo cual ha conducido al desarrollo de kits por varias empresas para lograr una obtención óptima. La correcta purificación de la fracción de pequeños RNA debe ser confirmada mediante electroforesis en gel. Sin embargo, el empleo de reactivos como el trizol son igualmente efectivos, permiten la extracción total, incluidos los rna pequeños.

### 2.8 Caracterización funcional de los miRNAs.

La función de los miRNAs esta asociada a la regulación de los mRNA blancos. Por lo tanto, se han desarrollado varios abordajes bioinformáticos y experimentales para identificar genes blanco de los miRNA. Varias plataformas de sitios de internet, incluyendo Targetscan, Mird, Miranda, Mirmap, Microcosm, y Diana Lab, predicen genes blanco basados en las secuencias complementarias de su 3'UTR;<sup>85</sup>sin embargo, las predicciones *in silico* también requieren confirmación *in vivo/in vitro*, de tal forma que se han desarrollado varias estrategias, tales como:a)el uso de oligonucleótidos sintetizados y verificados en diversos modelos, los miRNAs sintéticos mimetizan al miRNA maduro para dirigirse a mRNAs específicos; b)"antimiRs", oligonucleótidos complementarios a los miRNAs endógenos diseñados para unírseles e inhibir su función; <sup>86</sup>c)"protectores blanco" – oligonucleótidos complementarios a una sección específica del mRNA de un gen blanco que son utilizadas para protegerlos de un miRNA dado; y, d)esponjas de miRNAs –un marco de lectura abierto (ORF) ligadora una región 3'UTR con múltiples sitios de unión específicos de miRNAs que actúa como un inhibidor competitivo de la unión a miRNA.<sup>87</sup>De forma importante, todas estas moléculas pueden ser transfectadas dentro de las células y su efecto puede ser investigado mediante análisis de Western Blot o PCR

cuantitativo. Como un control de transfección, se utilizan miRNAs “aleatorios” carentes de cualquier homología génica conocida en los mamíferos.<sup>88</sup>

La señalización directa a genes con miRNA puede ser explorada con ensayos de luciferasa, al combinar sistemas utilizando los genes “firefly” y “renilla”. La mayoría de los genes de interés, los cuales se predice son blancos de miRNAs, están disponibles dentro del sitio de multiclonación del plásmido con la luciferasa/firefly (MCS) ya ligado dentro de sus regiones 3'UTR. Cuando los oligonucleótidos sintéticos (“aleatorios”, mimetizantes, o antimiRs) y sus vectores son cotrasfectados dentro de una línea celular de mamífero, el vector expresa constitutivamente la luciferasa “renilla” y “firefly”;<sup>89</sup> sin embargo, si la represión de la traducción es realizada por un miRNA específico en la región 3'UTR del mRNA de la luciferasa “firefly”, su señal de luminescencia (pero no la de la luciferasa “renilla”) disminuye. El gen de la luciferasa “renilla”, bajo el control de un promotor constitutivo, puede ser contrasfectado (en el mismo o un distinto plásmido) dentro de las células con una señal normalizante.<sup>90</sup> Una vez que los genes blancos de miRNAs se predicen y confirman, la caracterización funcional requiere ahora el análisis de las funciones biológicas que controlan estos genes. Por lo tanto, aún se deben realizar más experimentos para evaluar parámetros tales como la proliferación, modificaciones del citoesqueleto, invasión celular, y propiedades de migración y sus procesos de diferenciación y des-diferenciación.

### *2.9 Los miRNAs como biomarcadores.*

Actualmente, en algunos casos se conoce con precisión el papel de los miRNAs circulantes y sus efectos de estas moléculas en sitios distantes del lugar de su síntesis. Otra característica de los miRNAs es su presencia en el plasma humano en una forma sumamente estable que se encuentra protegida de la actividad de RNAasas endógenas.<sup>91</sup> Como resultado de esta característica, los miRNAs están siendo actualmente evaluados como biomarcadores circulantes en la detección de muchos procesos humanos tanto fisiológicos como patológicos. Se han detectado niveles elevados de miRNAs en el suero de pacientes con cáncer.<sup>92</sup> Varios estudios pioneros han detectado miRNAs de presunto origen placentario en el suero de mujeres

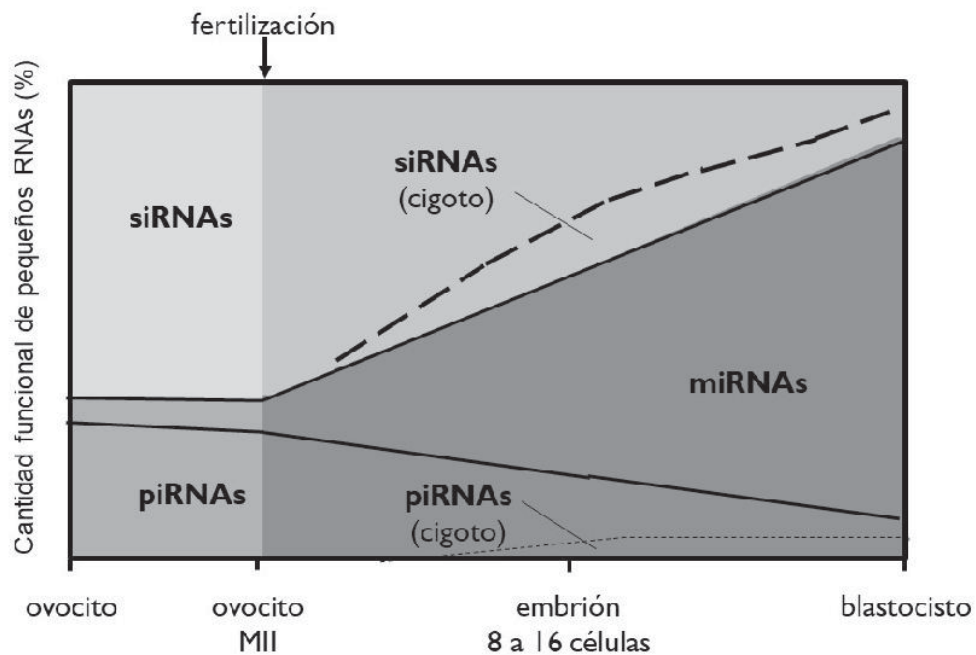
embarazadas.<sup>93</sup> Otros han demostrado que los miRNAs asociados a la placenta humana estaban significativamente elevados en suero de pacientes embarazadas, y sus niveles correlacionaban con el estadio del embarazo.<sup>94</sup>

Los miRNAs en suero son relativamente estables, y no son degradados después de la exposición a altas temperaturas, altos o bajos niveles de pH, o ciclos de congelación-descongelación.<sup>84</sup> Este fenómeno podría ser explicado por el reciente hallazgo de complejos proteína-lipoproteína (también conocidos como exosomas) que actúan como vehículos de miRNAs.<sup>95</sup> Recientemente se ha descrito que estas vesículas de 20-100 nm contienen miRNAs y son liberadas a través de mecanismos dependientes de la maquinaria secretora de ceramidas, las cuales pueden ser transferidas a células receptoras mediante endocitosis. Los miRNAs podrían ser también transportados en lipoproteínas de alta densidad HDLs, e internalizadas en células receptoras mediante una vía que involucra nSMase2 (neutral SphyngoMyelinase 2).<sup>95</sup> Sin embargo, otro estudio reciente demostró que hasta un 90% de los miRNAs séricos y plasmáticos no están encapsulados en vesículas, sino que se cofraccionan en complejos proteicos, en particular complejos AgoII-miRNA.<sup>96</sup>

Varios miRNAs presentes en el suero predicen o se correlacionan con estados patológicos y su pronóstico en varios tipos de neoplasias. Más aún, comparado con los abordajes transcriptómicos o proteómicos, es más fácil adaptar su uso en clínica dado que sólo existen aproximadamente 1500-2000 miRNAs humanos detectables.<sup>50</sup> Sin embargo, un obstáculo importante para el uso de miRNAs como un método biomarcador no invasivo es la presencia de información contradictoria publicada en relación a las mismas patologías. Esto podría explicarse por la falta de estandarización metodológica común en el campo, tal como la obtención de la muestra o técnicas de normalización de PCR cuantitativo. Respecto a lo primero, es importante controlar o evitar la hemólisis así como el uso de EDTA dado que este bloquea la reacción de la polimerasa en el PCR. Respecto a lo segundo, la consistencia en los resultados podría ser mejorada al agregar miRNAs sintéticos (derivados de distintos organismos) a la mezcla de PCR, tales como “cel-miR-39” de *C. elegans*.<sup>97</sup>

## 2.10. Los miRNAs embrionarios

Se ha descubierto que los miRNAs, a diferencia de otros pequeños RNA no codificantes, se expresan de forma muy importante en los embriones humanos en día 5 de desarrollo, y estos se pueden medir en el medio de cultivo, los patrones de expresión intracelulares difieren entre blastocistos euploides y aneuploides, (el miR-372 fue el que demostró mayor nivel de expresión en embriones euploides), además de que se encontró una expresión diferencial dependiendo del sexo embrionario<sup>98</sup>. Por otro lado, no existen estudios que evalúen el perfil de expresión de miRNAs en embriones humanos en día 3 de desarrollo, pese a la evidencia de su expresión desde estadios mas tempranos del desarrollo, incluso en línea germinal (fig 4).<sup>99</sup>



**Figura 4 Expresión de los pequeños RNA no-codificantes en diferentes estados de desarrollo.** En el estadio pre-embriionario (ovocito-ovocitos MII), la línea germinal femenina, presenta en el mayor porcentaje la expresión de RNA pequeños no codificantes que corresponde a siRNAs y piRNAs, lo cual tiene un sentido funcional, ya que debido a la inestabilidad genómica durante la recombinación se presenta un alto nivel de expresión de elementos genéticos móviles, (p. Ej. retrotransposones) y son necesarios los piRNAs y siRNAs para silenciarlos. A partir de la MII, se observa un aumento progresivo en la expresión de miRNAs que culmina con la fertilización por un espermatozoide. Los miRNAs adquieren un papel relevante ya que regulan vías de diferenciación y pluripotencia, mientras que los piRNAs y siRNAs van disminuyendo su porcentaje de expresión a medida que el genoma se estabiliza y disminuye

la transcripción de elementos genéticos móviles. La figura se obtuvo de Ohnishi y colaboradores (2010).<sup>99</sup>

Onishi y colaboradores (2010) describieron la transición en la expresión de pequeños RNA no codificantes en el desarrollo temprano de embriones murinos, demostrando el cambio en la expresión a partir de línea germinal, donde más del 90% de la expresión corresponde a piRNAs y siRNAs, relacionados con el silenciamiento de elementos genéticos móviles, hacia la expresión de miRNAs, que están asociados a la regulación de genes de pluripotencia y diferenciación, como Nanog (un factor de transcripción involucrado con la autorrenovación de Células Madre Embrionarias), Smad1, (un transductor de señales y regulador transcripcional en vías relacionadas con morfogénesis, desarrollo y apoptosis) N-myc (Myelocytomatosis-N), Zfx (Zinc Finger X Chromosomal protein), Socs3 (Supresor of Cytokine Signaling), Tbx3 (T-Box Transcription factor 3), y Chd1 (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein); la expresión de miRNAs en día 3 de desarrollo corresponde aproximadamente al 50% de la producción total de RNA pequeños no codificantes.

## **miRNAs y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO**

Se piensa que los miRNAs controlan vías críticas esenciales en el desarrollo y diferenciación embrionarias. Por ejemplo, la expresión diferencial de miRNAs, en particular los embriones con expresión nula (knockout) de miRNAs pertenecientes a la familia miR-302 en pollos, conduce a defectos del tubo neural. Aunque múltiples genes incrementan su expresión debido a esta alteración, el aumento en uno de los genes blanco, Fgf15 en el neuroepitelio, induce la diferenciación neuronal precoz.<sup>100</sup> Se ha descrito que miR-206 interactúa con la región no traducida 3'(UTR) de Otx2 (Orthodenticle Homeobox 2), un miembro de la subfamilia de factores de transcripción con homeodominio; regulando la proliferación celular neural y apoptosis via Otx-2.<sup>101</sup> Las células madre embrionarias humanas son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, que pueden mantenerse indefinidamente en cultivo.<sup>102</sup> La pluripotencia, diferenciación y proliferación de las hESCs (Human Embryonic stem Cells) están influenciadas por factores de transcripción que median sus acciones en conjunto con miRNAs. Se ha determinado que los miRNAs participan en la transición de células pluripotentes hacia formas diferenciadas de



organogénesis, por ejemplo el miRNA-877 induce la degradación del mRNA de SOX2 (Sex determining Region Y-Box2), un potente antagonista mesodérmico, lo cual dirige la diferenciación de un programa cardíaco.<sup>103</sup> El miR-372 y let-7 actúan de forma antagónica en la diferenciación de la línea celular a partir de células madre embrionarias humanas (hESC); el bloqueo (knockdown) de algunos de los blancos moleculares de miR-372 como SMARCC1 (SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily C Member 1), MECP2 (Methyl-CpG Binding Protein 2), CDKN1 (Cycline Dependent Kinase Inhibitor), RBL2 (RB transcriptional Corepressor 2), RHOC (Ras homolog Family member C) y TGFBR2 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 2) incrementa la producción de células germinales primordiales.<sup>104</sup> El estado de pluripotencia de las hESC involucra la expresión de miRNAs de la familia Let-7 y la expresión concurrente de las proteínas LIN28, (LIN28A y LIN28B),<sup>105</sup> las cuales tienen un papel fundamental en la pluripotencia y reprogramación celular mediante la regulación transcripcional de la expresión de Oct4, Nanog y Sox4.<sup>106, 107</sup> Los microRNAs podrían incluso determinar el destino embrionario antes de la implantación alterando la receptividad endometrial.<sup>108</sup> En blastocistos con fallo de implantación, el miR-661 demostró la mas alta expresión en medios de cultivo, la internalización de miR-661 por células endometriales epiteliales humanas disminuyó la unión del modelo esferoidal de trofoblasto (un sistema tridimensional de cultivo celular que mimetiza muchas de las características *in vivo* del trofoblasto) vía inhibición de PVRL1 (Poliovirus Receptor Related)<sup>109</sup> también conocido como Nectina-1, una proteína involucrada en la adhesión celular.<sup>110</sup>

En embriones humanos, existe al menos un estudio que evalúa el perfil de expresión de miRNAs. En el estudio de Rosenbluth *et al*, (2013) se analizaron mediante TLDA (Taqman Low Density Array) 754 miRNAs, de los cuales 135 se detectaron en embriones euploides utilizando un valor de Ct promedio de 35. Los miRNAs de mayor expresión en medio de cultivo embrionario, (que fueron el 5%) presentaron valores Ct de mas de 28.5, y se detectaron consistentemente en todas las muestras. La expresión de varios de los miRNAs, incluyendo el miR-372, -720, y el -302c, se confirmaron en ensayos de PCR en tiempo real.<sup>98</sup> Estos autores encontraron expresión diferencial de 39 miRNAs en embriones euploides vs embriones aneuploides, estos miRNAs, se expresaron de forma significativamente mayor en embriones euploides, para confirmar el análisis TLDA, eligieron 7 miRNAs con una diferencia de al menos ocho veces entre los dos grupos de embriones, con un incremento en la expresión de los 4 miRNAs en embriones euploides



respecto a los embriones aneuploides. Los miRNAs seleccionados en la validación de qPCR fueron miR-27, -141, -339-3p, y -345, los cuales demostraron una expresión diferencial en la cohorte expandida.<sup>98</sup> Las principales vías génicas reguladas por estos miRNAs de expresión diferencial en embriones euploides y aneuploides fueron la vía de señalización MAPK, vías de adhesión focal, regulación del citoesqueleto de actina, y la vía de señalización Wnt.

Además, se demostró que el miRNA-518d, del cluster C19MC, (el cluster humano más grande, mide mas de 100 kb, contiene 46 genes pre-miRNA, y esta localizado en el cromosoma 19) <sup>111</sup>presenta expresión diferencial en embriones masculinos vs embriones femeninos; se confirmó mediante qPCR que miR-518d-5p se expresa de forma significativamente mayor en embriones masculinos, (5.6 veces más que en femeninos).<sup>53</sup> Uno de los blancos moleculares de miR518d es el gen del factor de Transcripción 3 relacionado a mab-3/doble-sexo, un gen que se considera crítico en la determinación sexual masculina.<sup>112</sup> Otros miembros de este cluster regulan la migración de las células trofoblásticas humanas.<sup>111</sup> El cluster C19MC, que sólo se encuentra en primates, desempeña un papel crucial en el desarrollo de los mamíferos y se ha reportado que se regula mediante impronta genómica, con la expresión exclusiva del alelo paterno en la placenta, con una impronta materna específica adquirida en el ovocito.<sup>113</sup>

De manera interesante, también RNU48, un RNA pequeño nucleolar (snoRNA) que a menudo se utiliza como control en experimentos de miRNAs, <sup>114</sup>se confirmó 1.7 veces más elevado en embriones masculinos respecto a los femeninos.<sup>98</sup> La tabla 2 muestra los miRNAs con mayor nivel de expresión en embriones humanos en el quinto día de desarrollo.

**Tabla 2. miRNAs con mayor expresión secretados por el embrión humano en desarrollo.**

miRNA	Valor promedio de cambio	Expresado en células madre humanas	Expresados en desarrollo embrionario	Expresados en placenta primate
miR-372	19.68 ± 1.12	X	X	
miR-512-3p	21.30 ± 1.182			X
miR-720	21.41 ± 1.07		X	
miR-127-4A	23.09 ± 1.28			
MiR-320	24.85 ± 0.97	X	X	

miR-302b	25.09 ± 1.65	X		
miR-106 <sup>a</sup>	26.10 ± 1.51		X	
miR17	25.20 ± 1.65	X	X	
miR-191	25.22 ± 0.97			
miR-484	25.36 ± 1.02		X	
miR-886-3p	25.68 ± 1.17			
miR-371-3p	25.80 ± 1.31	X		
miR-302c	26.12 ± 1.07	X	X	
miR-19b	26.15 ± 1.45	X		
miR-378	26.33 ± 1.0			
miR-520c-3p	26.49 ± 1.28			X
miR-373	26.49 ± 1.59	X		
miR-146b-5p	26.56 ± 1.30		X	
miR-520D-3p	26.67 ± 1.53			X
miR-302d	26.75 ± 1.09	X	X	
miR-24	26.75 ± 1.43	X		
miR-302a	26.76 ± 4.18	X		
miR-362	26.77 ± 1.37	X	X	
miR-20 <sup>a</sup>	26.92 ± 1.49			
miR-127s	27.08 ± 2.34		X	
miR-30c	27.34 ± 1.24			
miR-200c	27.40 ± 1.17	X		
miR-92a	27.42 ± 1.70	X	X	
miR-151-3p	27.44 ± 1.50			
miR-193b	27.60 ± 0.93			
miR-1260	27.61 ± 3.89	X		
miR-1244	27.84 ± 1.96	X		
miR-192	27.95 ± 1.14			
miR-374a	28.00 ± 0.97	X		
miR-519a	28.15 ± 1.49			X
miR-154	28.19 ± 0.85			
miR-517c	28.45 ± 1.71			X
miR-302a	28.45 ± 1.25	X		

La tabla fue tomada de Rosenbluth y colaboradores (2013).<sup>98</sup>

A continuación se detallan las funciones, blancos moleculares y vías involucradas en la regulación de los 4 miRNAs seleccionados, con énfasis en su papel dentro del desarrollo embrionario y la implantación.

### 2.10.1 miR-21-3p

Este miRNA se encuentra altamente expresado en hESCs,<sup>115</sup> así como en las neoplasias malignas, la mayoría de sus genes blanco son supresores

tumorales, por lo que miR-21 promueve la proliferación celular,<sup>116</sup> invasión, metástasis, inestabilidad genómica y mutación, inflamación, inmortalización replicativa, metabolismo celular anormal, angiogénesis, evasión de la apoptosis, destrucción inmune y supresión del crecimiento. En particular, el miR-21 está fuertemente asociado a la evasión de la apoptosis, además se ha involucrado en la migración e invasión celular en osteosarcoma, lo cual podría relacionarse a la capacidad de implantación embrionaria.

### *2.10.2 mir-24-1-5p*

Este miRNA inhibe el desarrollo de células B y potencia el desarrollo de monocitos y granulocitos, lo cual indica una función directamente relacionada con la diferenciación celular.<sup>117</sup>

En embriones murinos, se ha demostrado que el miR-24 es esencial para la diferenciación de Células madre embrionarias en progenitores hematopoyéticos, el fenotipo de la supresión de miR24 no involucra un defecto general del mesodermo dado que se observa producción de precursores mesodérmicos, así como células endoteliales y cardíacas derivadas del mesodermo.<sup>118</sup>

### *2.10.3 miR-191-5p*

El primer reporte que señala la regulación de mir-191 en el desarrollo proviene de la observación de que especímenes post mortem de corteza prefrontal humana mayores de 41 años expresan niveles más elevados de miR-191 comparados con individuos menores de 15 años. Se sugiere que miR-191 disminuye la expresión del factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de esta forma contribuye al desarrollo cortical.<sup>119</sup> miR-191 también es uno de los miRNA mas importantes en tejido neural de la rata, y su expresión incrementa 2 a 5 veces durante el desarrollo cortical, lo que sugiere un papel en la diferenciación cortical.<sup>120</sup> La asociación de miR-191 con la diferenciación celular se ha hecho patente en los últimos años, miR-191 se encontró con expresión disminuída durante la diferenciación eritroide, CFU-E (Colony Forming Unit) hacia estadio Ter19+, mientras que EL incremento de su expresión inhibe la enucleación y condensación de la

cromatina, lo que sugiere que miR-191 juega un papel crucial en la eritropoyesis.<sup>121</sup> Los niveles de miR-191 se expresan de forma diferencial en monocitos comparados con sus descendientes más diferenciados, las células dendríticas.<sup>122</sup> Los niveles de miR-191 cambian de manera importante en osteoblastos después del tratamiento con regeneradores óseos, por lo que se propone que miR-191 podría mediar estas funciones de reparación en dicho tejido.<sup>123</sup> Todos estos hallazgos sugieren que miR-191 tiene un papel importante en el desarrollo y la diferenciación.

Los blancos moleculares de miR-191 van desde remodeladores de la cromatina hasta factores de transcripción y reguladores del ciclo celular, por ejemplo SATB1 (Special AT-rich –sequence-binding-protein-1), la supresión de esta proteína se ha asociado con senescencia celular.<sup>124</sup> EGR1, (early growth response protein 1) un factor de transcripción tipo dedos de Zinc fundamentalmente involucrado en el crecimiento celular, desarrollo y homeostasia de células madre.<sup>125</sup> Otros genes blanco importantes son SOX4 y SRY, involucrados en la regulación del desarrollo, diferenciación, proliferación, apoptosis y transición epitelio mesenquimatoso.<sup>126</sup> y reguladores del ciclo celular como CDK6, (Cinasa dependiente de ciclinas tipo 6)<sup>127</sup> y CCND2 (ciclina D2) que al ser inhibida por miR-191 suprime la vía P13/AKT suprimiendo la proliferación celular.<sup>128</sup>

#### 2.10.4 miR-372-5p

El miR-372 forma parte de una gran familia de miRNAs que se expresan en células madre embrionarias de ratón, denominada ESCC miRNAs, y sus blancos son múltiples inhibidores de la vía Ciclina-Cdk2, lo cual promueve el programa de ciclo celular específico de estas células.<sup>129</sup> Esta familia de miRNAs potencia la eficiencia de reprogramación de los fibroblastos embrionarios hacia iPSCs, (Induced pluripotent Stem cells).<sup>130, 131</sup> Esta liberación del ciclo celular sugiere un incremento en la eficiencia de la desdiferenciación.

Los ortólogos humanos de miRNAs ESCC también se expresan en altos niveles en células madre embrionarias humanas, disminuyendo su expresión durante la diferenciación; estos miRNAs incluyen al cluster humano miR-302

(hsa-miR-302a-d) en particular el miR372, que es ortólogo del miR-294 murino.<sup>132</sup> Hsa-miR-372 promueve la reprogramación celular al regular la transición epitelio-mesenquima, a través de múltiples blancos moleculares, los cuales se agrupan en 5 módulos funcionales: a) regulación del ciclo celular, (CDKN1A, RBL2, CDC2L6); b) regulación epigenética (MECP2, MDB2, SMARCC2); c) transporte vesicular (RAB5C, RAB11FIP5); d) señalización celular (AKT1, ARHGAP26); y e) transición epitelio mesenquimatosa (RHOC, TGFBR2).<sup>133</sup>

### **3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La falla en la implantación es una patología que afecta a cerca del 15% de las pacientes que ingresan a tratamientos de fertilización *in vitro*; hasta el momento no se ha logrado encontrar una causa definitiva que explique porque embriones de calidad morfológica adecuada no logren generar un saco gestacional (evidencia de implantación) en presencia de un endometrio receptivo. Actualmente no existen métodos cuantitativos para el análisis de la capacidad de implantación embrionaria, únicamente se utiliza en la clínica la morfología embrionaria como marcador cualitativo de la calidad y capacidad de implantación de éste. Sin embargo, este método no ha demostrado una correlación clínica aceptable, ya que incluso los embriones aneuploides pueden presentar una morfología normal, y algunos embriones euploides pueden presentar morfologías anormales. Los miRNAs pueden ser utilizados como biomarcadores de implantación ya que son secretados activamente al medio extracelular, se pueden determinar blancos moleculares relacionados con la expresión de marcadores de implantación endometriales además de estar involucrados directamente con vías de diferenciación, proliferación y mantenimiento de pluripotencia en el embrión.

#### **4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

1.- ¿Existirá diferencia en la expresión de los miR-21-3p, -24-1-5p, -191-5p y -372-5p en los medios de cultivo de embriones transferidos a pacientes que logran la implantación con respecto de aquellas que no la logran?

#### **5.0 JUSTIFICACIÓN**

Gracias a las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad se han logrado superar la mayoría de las causas de infertilidad humana; sin embargo, una vez que se ha estimulado el ovario para la posterior obtención de ovocitos y su fertilización *in vitro*, existe un gran número de casos en los que se transfieren embriones aparentemente sanos y no se logra la implantación.

El proceso de implantación humana es sumamente complejo e involucra una comunicación molecular continua entre el endometrio y el embrión. Esta comunicación está mediada por moléculas muy diversas, desde citocinas y hormonas hasta miRNAs.

Actualmente no existen métodos cuantitativos para el análisis de la capacidad de implantación embrionaria, únicamente se utiliza en la clínica la morfología embrionaria como marcador cualitativo de la calidad y capacidad de implantación de éste. Sin embargo, este método no ha demostrado una correlación clínica aceptable, ya que incluso los embriones aneuploides pueden presentar una morfología normal, y algunos embriones euploides pueden presentar morfologías aberrantes. Por lo que en el presente estudio, se propuso determinar en el medio de cultivo de embriones con buen desarrollo morfológico si existen diferencia significativas en la expresión de cuatro miRNAs entre aquellos embriones con y sin implantación.

#### **6.0. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

##### *6.1 Objetivo general*

Evaluar en el medio de cultivo la secreción de cuatro miRNAs embrionarios asociados al proceso de implantación en pacientes que acudan al programa de fertilización *in vitro*.

### *6.2 Objetivos particulares*

1. Determinar la expresión del miR-21-3p, -24-1-5p, -191-5p, y -372-5p en el medio de cultivo de los embriones con buen desarrollo morfológico y que lograron su implantación.
2. Determinar la expresión del miR-21-3p, -24-1-5p, -191-5p, y -372-5p en el medio de cultivo de los embriones con buen desarrollo morfológico y que no lograron su implantación.
3. Comparar el nivel de expresión de los miRNAs entre el medio de cultivo de los embriones con y sin implantación.

### *6.3 Hipótesis*

Existirá mayor expresión de los miRNAs en el desarrollo de los embriones humanos de las pacientes que tengan evidencias clínicas de implantación con respecto a los casos negativos.

## **7.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *7.1 Características de la muestra de estudio*

Para demostrar los objetivos planteados se incluyeron dos tipos de parámetros con respecto a las pacientes y al desarrollo de los embriones:

1. Pacientes con diagnóstico de infertilidad, definida como la incapacidad para concebir en una pareja sexualmente activa posterior a un año de coito sin protección anticonceptiva.

2. Embriones con buen desarrollo morfológico transferidos a la cavidad uterina.

#### *Criterios de inclusión*

Maternos: Pacientes previamente sometidas a un protocolo de estudio de infertilidad y que cumplan criterios para realizar fertilización *in vitro* (oclusión tubaria bilateral, endometriosis leve o moderada, edad mayor o igual a 35 años, anovulación crónica sin éxito en técnicas de baja complejidad).

Embrionarios: Embriones en día 3 del desarrollo y que se transfirieron a la cavidad uterina con calidad embrionaria tipo I, II o III.

#### *Criterios de no inclusión*

Maternos: Cáncer endometrial, antecedente de miomectomía con ingreso a cavidad uterina, hiperplasia endometrial, endometriosis severa. Pacientes cuyo factor de infertilidad sea el masculino. Pacientes a quienes se transfirieran dos o más embriones en cavidad uterina.

Embrionarios: Aquellos embriones que se transfirieran en conjunto con otro embrión, embriones que se transfirieran en un estadio distinto al día 3 de desarrollo (blastocisto), embriones con mala calidad morfológica (calidad IV o inferior)

#### *Criterios de exclusión*

Aquellos casos en los que la madre no acuda a un estudio ultrasonográfico 4 semanas después de presentar una prueba de embarazo positiva.

#### *7.1.1 Estimulación hormonal de las pacientes*



Las pacientes incluidas recibieron estimulación ovárica controlada con el uso de Gonadotropinas exógenas (FSH con o sin suplemento de LH) durante un periodo no mayor a 12 días, con la adición de análogos de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) para evitar un pico prematuro de LH.

Una vez que se alcance un diámetro folicular de 18 mm por dos o más folículos se estimulará la maduración ovocitaria final mediante el uso de Gonadotropina Coriónica Humana para simular el pico de LH endógeno debido a la similitud estructural de estas hormonas, 34-36 horas después de la administración de Gonadotropina Coriónica Humana se llevará a cabo la captura folicular a través de los fondos de saco vaginales utilizando guía ultrasonográfica. Una vez que se obtengan los ovocitos se procederá a realizar la fertilización in vitro o la inyección directa de los espermatozoides al citoplasma ovocitario, la decisión de la técnica de fertilización dependerá fundamentalmente del factor masculino. Ante un factor masculino severamente afectado en concentración espermática, movilidad o morfología, se optará por la Inyección Intracitoplásmica de espermatozoides, estos embriones serán excluidos. 24 hs posterior a la captura folicular se evaluará la fertilización mediante el análisis morfológico de los cigotos, fundamentalmente por la presencia de un segundo corpúsculo polar.

Los ovocitos fertilizados exitosamente se mantendrán en medios de cultivo específicos (PLUS de Vitrolife™G-1) durante tres a cinco días para ser transferidos directamente al útero utilizando cánula de transferencia de Cook flexible técnica Soft Pass, con guía Ultrasonográfica abdominal.

#### *7.1.2 Extracción del RNA total a partir del medio de cultivo de los embriones humanos en desarrollo.*

De los embriones en día tres de desarrollo se tomó 50 µl del medio de cultivo y fue mezclado con 100 µL del reactivo de TRIzol (InvitroGen; Carlsbad, CA). La mezcla se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubó por 15 min a 30°C.

Posteriormente a cada muestra se le añadió 100µl de cloroformo (Invitrogen) y se agitó por 15 segundos. La mezcla fue incubada por 5 min a 30°C. Al término la muestra fue centrifugada a 4 000 rpm por 15 min y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregó 550 µl de isopropanol (Invitrogen) y 1 µl de glucógeno (Invitrogen). Posteriormente la mezcla fue incubada por 1 hora a -20°C.

Al término de éste tiempo las muestras fueron centrifugadas a 4 000rpm por 30 min. Al pellet se le adicionó 1 ml de etanol al 100% y se agitó vigorosamente por 15 segundos y fueron nuevamente centrifugadas a 4000 rpm por 15 min. El procedimiento se repitió una vez más con etanol al 75%. Finalmente los tubos se dejan a temperatura ambiente y en posición invertida para permitir la evaporación del etanol. Al día siguiente se disuelve el RNA con 20 µl de agua inyectable.

### 7.1.3 Reacción de retro-transcripción.

Para la obtención del cDNA se utilizó el kit de RT-PCR system (RT-PCR, cat A1250; Promega Madison WI, USA). Se tomaron 2.5 µL de cada una de las muestras y se preparó el mix de RT con 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO<sub>4</sub> [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de AMV RT y 1 µL de iniciador específico de RT miR-451 [20 pmol; tabla 3]. La síntesis del cDNA se realizó durante 45 minutos a una temperatura de 45°C.

**Tabla 3. Secuencia de los iniciadores específicos para RT de los miRNAs embrionarios humanos.**

hsa-miR	Secuencia 5'-3'
21-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATA CGACACAGCC
24-1-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATA CGACACTGAT
191-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATA

	CGACCAGCTG
372-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATA CGACAGAATA

La secuencia fue determinada mediante la complementariedad de los últimos seis nucleótidos sustituyéndolo por uracilo o timina (en rojo) y se añadió la secuencia complementaria universal de 44 nucleótidos (en azul).

#### 7.1.4 Reacción de aplicación por PCR.

A partir del cDNA obtenido se trabajó con 10 µL del mismo y con un mix de PCR el cual contenía 5 µL de Buffer AMV-Tfi 5X, 1 µL dNTP [10 mM], 2 µL MgSO<sub>4</sub> [50 mM], 10 µL agua libre de RNAsas, 1 µL de Tfi, 1 µL de iniciador específico para PCR miR-451 [20 pmol; tabla 4] y 1 µL iniciador universal [20 pmol]. Cada uno de los tubos fueron procesados en el termociclador con el siguiente programa: 94°C para una elongación inicial durante un minuto y 40 ciclos con 94°C durante 30 segundos, 56°C en 30 segundos, 72°C durante 30 segundos. Se realizó una elongación final de 72° durante 10 minutos.

**Tabla 4. Secuencia de los iniciadores específicos para PCR de los miRNAs embrionarios humanos.**

hsa-miR	Secuencia5´-3´
21-3p	CGGCCGCAACACCAGT
24-1-5p	CGGCCGTGCCTACTGA
191-5p	CGGCCGCAACGGAATC
372-5p	CGGCCGCCTCAAATGTG

La secuencia fue determinada mediante el sitio web [www.mirBase.org](http://www.mirBase.org).

Los amplificadores de cada reacción fueron sometidos a geles de agarosa al 4% a voltaje constante por 40 minutos y las bandas de expresión fueron visualizadas en luz UV. Las imágenes fueron capturadas usando el sistema fotodocumentador (Gel Doc 2000. Bio-Rad, USA). De cada banda de expresión se obtuvo la densidad óptica mediante el programa ImageJ (NIH; USA).

#### *7.4 Análisis estadístico*

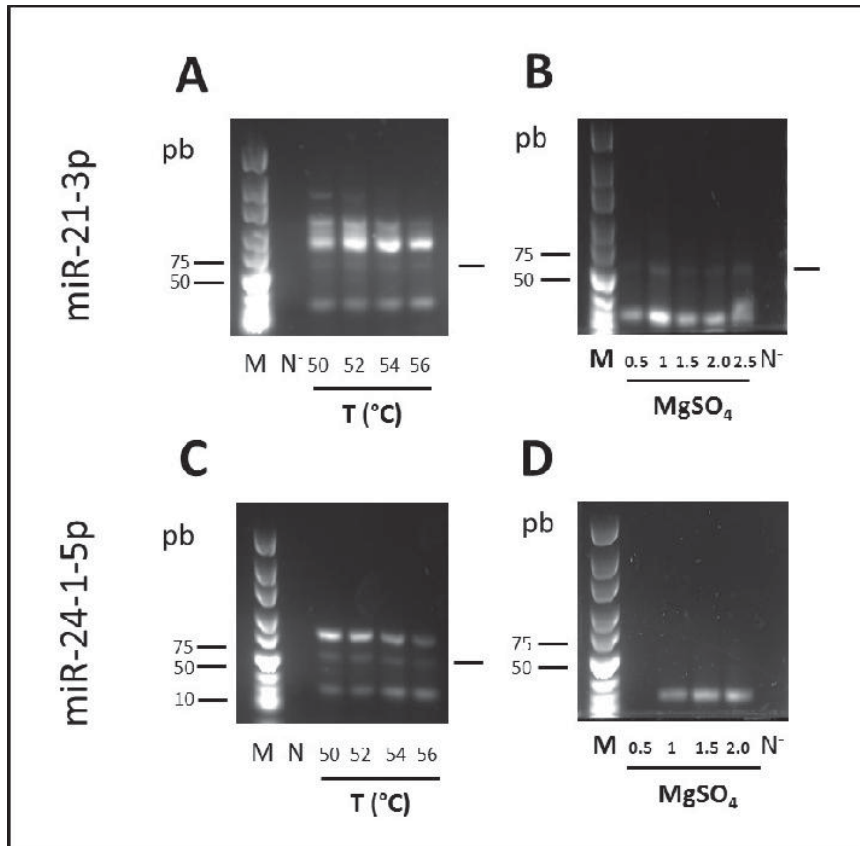
Los valores de expresión de cada miRNA son mostrados como la media  $\pm$  desviación estándar y se determinó la diferencia estadística significativa menor a 0.5 mediante la prueba de t-Student.

## **8.0 RESULTADOS**

### *8.1 Amplificación de PCR de punto final de los miRNAs procedentes del medio de cultivo de los embriones humanos en desarrollo.*

Para validar la expresión de los miRNAs se prosiguió a su estandarización para lo cual se tomó como referencia el medio de cultivo de un embrión con calidad tipo II y que logró generar un saco gestacional (implantación positiva).

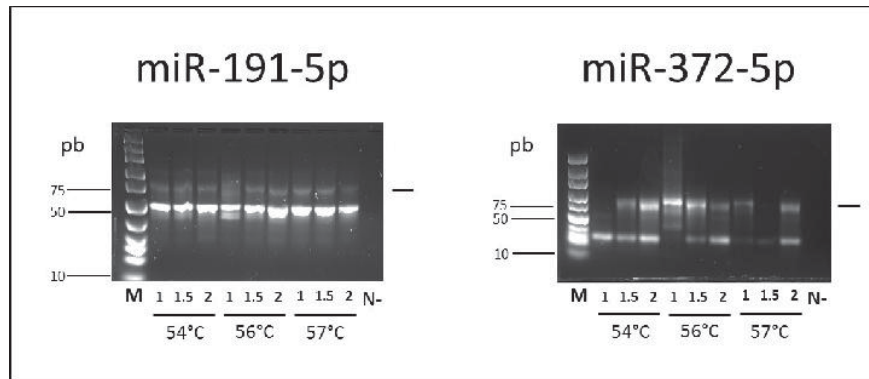
La figura 5 muestra la estandarización por temperatura (50°C, 52°C, 54°C y 56°C) y por concentración de MgSO<sub>4</sub> (0.5, 1, 1.5 y 2 mM) para el miR-21-3p (A-B), y 24-1-5p (C-D).



**Figura 5 Estandarización del miR-21-3p y -24-1-5p embrionario humano del medio de cultivo.** A partir de un embrión con desarrollo tipo II, se establecieron las condiciones por temperatura de alineamiento (50, 52, 54, y 56 °C; **A** y **C**) y por concentración de sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ; 1, 1.5 y 2 mM). La línea indica el producto de PCR esperado. Marcador (M; CASA COMERCIAL), pares de bases (pb) y control interno negativo (N<sup>-</sup>).

Se observa a las diferentes temperaturas la banda de interés de 75 pares de bases; sin embargo, se encontraron otras bandas ubicadas entre los 200 y 50 pares de bases y una de menor peso molecular de aproximadamente 15 pares de bases (fig. 3A y C). La curva con diferentes concentraciones de  $MgSO_4$  reduce significativamente la detección de las bandas de mayor tamaño; sin embargo, no se observó la disminución en la banda de menor tamaño (fig. 3B y D). Con estos resultados se sugirió para los miRNA-21-3p y el miR-24-1-5p la temperatura de 54 °C y con 1 mM de  $MgSO_4$ .

La figura 6 muestra la estandarización por temperatura (54, 56 y 57) y por concentración de  $MgSO_4$  (0.5, 1, 1.5 y 2  $\mu L$ ) para el miR-191-5p y el miR-372-5p.



**Figura 6 Estandarización del miR-191-5p y -372-5p embrionario humano del medio de cultivo.** A partir de un embrión con desarrollo tipo II, se establecieron las condiciones por temperatura de alineamiento (54, 56, y 57 °C) y por concentración de sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ; 1, 1.5 y 2 mM). La línea indica el producto de PCR esperado. Marcador (M; CASA COMERCIAL), pares de bases (pb) y control interno negativo (N').

Se observa a las diferentes temperaturas la banda de interés ubicada a 75 pares de bases, la curva con diferentes concentraciones de  $MgSO_4$  reduce significativamente la detección de las bandas de mayor tamaño; sin embargo, no se observó la disminución en la banda de menor tamaño (fig. 4).

Con estos resultados se sugirió para los miRNA-191-5p y -372-5p la temperatura de 57 °C y 56 °C respectivamente y con 1 mM de  $MgSO_4$ . La tabla 5 muestra las condiciones de concentración de  $MgSO_4$  y de temperatura para cada miRNA del medio de cultivo de los embriones humanos.

**Tabla 5 Condiciones de  $MgSO_4$  y de temperatura de alineamiento para los miRNAs del medio de cultivo de embriones humanos.**

miRNA	Temperatura (°C)	$MgSO_4$ (mM)
21-3p	54	1
24-1-5p	54	1
191-5p	57	1
372-5p	56	1

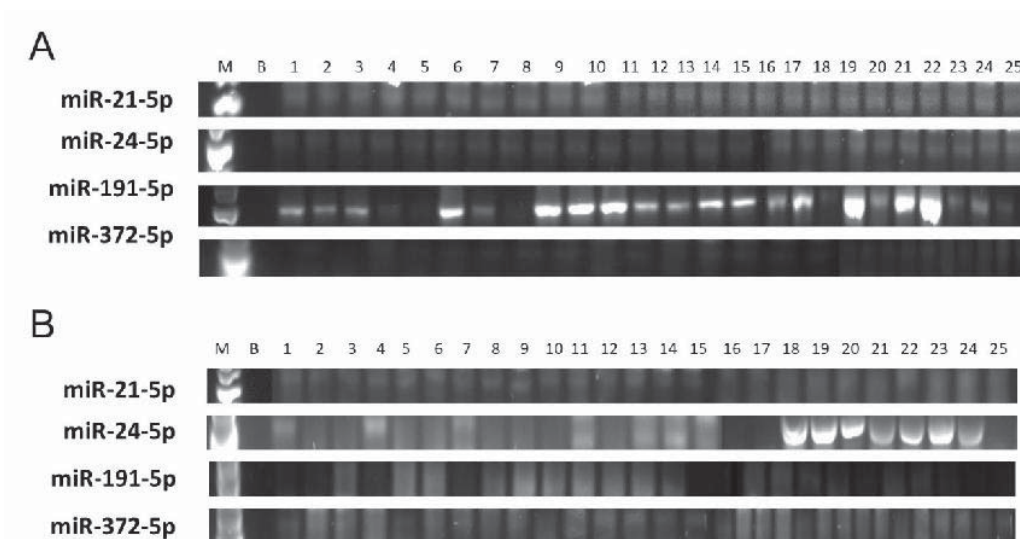
Con éstas condiciones se prosiguió a determinar en el medio de cultivo el perfil de expresión de los cuatro miRNAs de los 50 embriones que fueron transferidos para su implantación y clínicamente se obtuvieron dos grupos de pacientes: 1) con embarazo clínico (n=25); y 2) sin embarazo clínico (n=25).

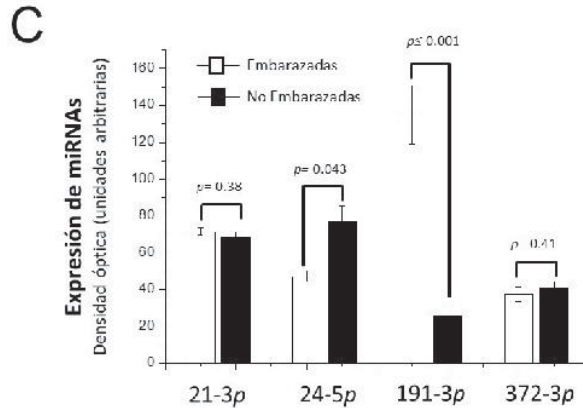
## 8.2 Expresión de los miRNAs de las pacientes embarazadas y no embarazadas.

La figura 7 muestra el perfil de expresión de los miRNAs obtenidos del medio de cultivo de los embriones humanos de pacientes embarazadas (fig 7A) y no-embarazadas (fig. 7B).

En el grupo de las pacientes embarazadas se determinó la banda de interés mediante su densidad óptica relativa, siendo las medias  $\pm$  1 desviación estándar:  $71.5 \pm 2.0$ ;  $47.18 \pm 2.9$ ;  $134.91 \pm 15.91$ ; y  $37.43 \pm 3.8$  para el miR-21, -24, -191 y -372 respectivamente.

En las pacientes embarazadas encontramos que el miR-191-5p es el que más se expresa en tanto que el miR-372-3p es el que presentó menor expresión (fig. 5A). No se encontró en la literatura un miRNA constitutivo de embriones humanos, se muestran los valores ajustados por concentración de RNA.





**Figura 7** Expresión de los miRNAs en el medio de cultivo de los embriones humanos con desarrollo tipo II. Marcador (Carril 1), control negativo (carril 2) muestras del medio de cultivo de las 25 pacientes embarazadas (A) y no-embarazadas (B). Se determinó la densidad óptica de cada banda y se muestra la media  $\pm$  desviación estándar. Se indica la diferencia significativa la cual fue realizada mediante la prueba de *t*-Student y se tomó como diferencia menor a 0.5.

La figura 7B muestra el perfil de expresión de los miRNAs obtenidos del medio de cultivo de los embriones humanos de pacientes no embarazadas. A la banda de interés se le determinó la densidad óptica relativa las cuales fueron de  $65.56 \pm 2.6$ ;  $77.0 \pm 8.3$ ;  $24.82 \pm 4.3$ ; y  $40.76 \pm 3.7$  para el miR21-3p, miR24-1-5p, miR-191-5p y miR-372-5p respectivamente.

En pacientes sin embarazo el miR-24-5p es el que más se expresa en tanto que el miR-191-5p es el que presentó menor cantidad de expresión (fig. 5B).

La figura 7C muestra la comparación en el nivel de expresión de los cuatro miRNAs en el medio de cultivo de los embriones humanas de las pacientes embarazadas y no-embarazadas.

El miR191-5p aumento significativamente 5.2-veces en el medio de cultivo de los embriones humanos de las pacientes embarazadas con respecto a las no-embarazadas ( $p \leq 0.001$ ); en tanto que el miR-24-1-5p aumentó significativamente 1.6-veces en el medio de cultivo de los embriones humanos de las pacientes no-embarazadas con respecto a las embarazadas ( $p = 0.043$ ; tabla 8).

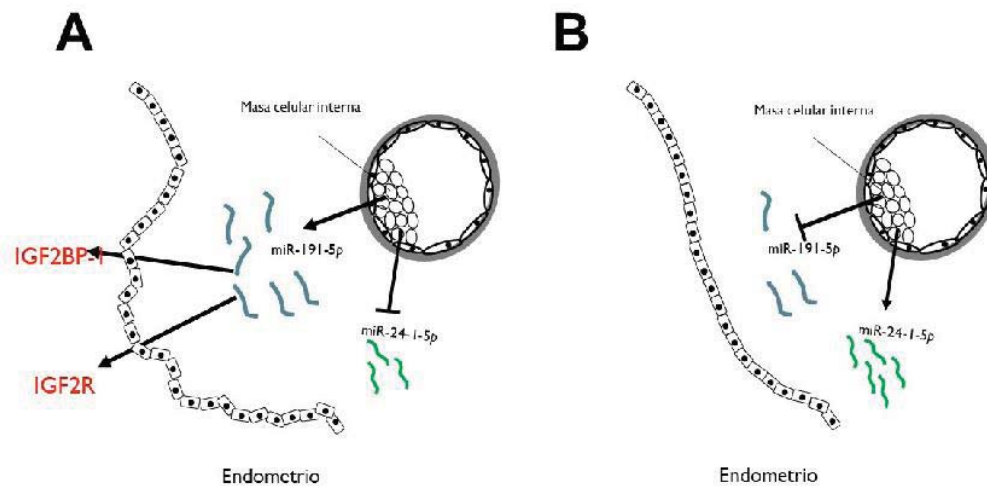
Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los miR-24-1-5p ( $p = 0.38$ ) y 372-5p ( $p = 0.41$ ) entre ambos medios de cultivo.



## 9.0 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que durante el desarrollo de los embriones murinos desde la etapa de división hacia blastocisto predomina la expresión de los miRNAs con respecto a otros RNA no-codificantes lo cual apoya su papel en la regulación de distintas vías de diferenciación y proliferación celular <sup>99</sup>. En nuestro estudio al determinar la expresión de cuatro miRNAs en el medio de cultivo se encontró que 1) en las pacientes embarazadas se expresa principalmente el miR-191-5p, en tanto que en las pacientes no-embarazadas aumentó el miR-24-1-5p (Fig 5C); y 2) los miRNAs que no mostraron cambio entre las pacientes embarazadas y no embarazadas fue el miR-21-3p y el -372-5p (Fig 8C).

La figura 8 muestra un modelo de la acción que tiene el miR191-5p sobre los marcadores endometriales en la ventana de implantación así como del miR-24-1-5p sobre la proliferación y migración celular.



**Figura 8** Expresión diferencial del miR-191-5p y del miR-24-1-5p en el medio de cultivo de los embriones humanos con desarrollo tipo II. La secreción del miR-191-5p por los embriones en desarrollo estimula en las células endometriales a la expresión de las proteínas asociadas con el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF2BP-1 e IGF2R) asociadas con la ventana de implantación induciendo cambios importantes sobre la decidualización del tejido endometrial (A).<sup>134</sup> Por su parte el aumento en la expresión del miR-24-1-5p en el medio de cultivo de los embriones en desarrollo de las pacientes no-embarazadas ha sido asociado con inhibición en la proliferación y migración celular (B).<sup>135</sup>

Rosenbluth y colaboradores (2014) demostraron un aumento en el miR-191 en el medio de cultivo de los embriones en desarrollo el cual estuvo asociado con implantación<sup>136</sup>. En los resultados de este estudio se observó un aumento significativo de 5.2-veces en el medio de cultivo de los embriones humanos de las pacientes embarazadas con respecto a las no-embarazadas. Recientemente Wang y colaboradores (2016) demostraron que la expresión del miR-191-5p modula diferentes proteínas dos de las cuales pertenecen a la familia del factor de crecimiento tipo insulina (IGF2BP-1 e IGF2R) con la ventana de implantación<sup>134</sup>.

Los hallazgos de este estudio, así como lo reportado en la literatura aportan evidencia indirecta de que los miRNAs además de representar potenciales biomarcadores de viabilidad, podrían ser secretados al medio extracelular con la finalidad de inducir la activación en las células o tejidos blanco favoreciendo su implantación y desarrollo embrionario.

De manera interesante se observó que el miR-24-1-5p se expresó 1.6-veces en los embriones de pacientes no-embarazadas (Fig 5C). Estudios previos se ha demostrado que algunos miRNAs, en particular los niveles elevados de miR-645 se correlacionan con resultados obstétricos adversos, como preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino<sup>98, 136</sup>, por lo que algunos miRNAs se asocian con mal pronóstico y otros con viabilidad embrionaria.

El hallazgo en nuestro estudio de que miR-24-1 estuvo fuertemente expresado en embriones con incapacidad para implantar en el endometrio, apoya la teoría de que existe un subgrupo de miRNAs que pueden reflejar una pobre calidad embrionaria. En el futuro, la descripción completa del miRNAoma embrionario podría ser una herramienta sumamente útil en el campo clínico.

Con respecto al miR-21-3p y el -372-5p que no mostraron cambios en la expresión entre las embarazadas y no embarazadas (Fig 5C). Se ha determinado mediante software de predicción que ambos miRNAs podrían ser considerados “constitutivos” ya que ambos están implicados en la regulación

de MAP3K-1y la ciclina CDK6, genes críticos en el ciclo celular, señalización y vías de apoptosis<sup>137</sup>. Se ha demostrado que miR-372 ayuda en la inducción de fibroblastos humanos hacia células madre pluripotenciales, lo cual sugiere un papel importante de este y otros miRNAs en el equilibrio entre la diferenciación y el mantenimiento de la pluripotencia celular<sup>133</sup>.

## **10.0 PERSPECTIVAS**

Las diferencias encontradas en la expresión del miR-24-1-5p y del miR-191-5psugieren que éstos podrían tener implicaciones funcionales sobre la expresión de marcadores de implantación a nivel endometrial, lo que establecería la comunicación coordinada entre las células embrionarias y el epitelio endometrial.

Se deberá determinar la cuantificación de estos miRNAs en tiempo real para poder confirmar lo que se observó en este estudio.

Posteriormente será importante realizar en el futuro estudios experimentales que determinen las vías moleculares reguladas por los miR24 y miR191 en células endometriales y su significado funcional durante la ventana de implantación, ya que se tiene evidencia de su función sobre el desarrollo

embrionario temprano pero se desconoce el efecto del incremento de su expresión (en el caso de miR-191) y la disminución en su expresión (en el caso de miR-24) sobre tejidos distantes, en este caso el endometrio decidual.

## 11.0 BIBLIOGRAFIA

1. Horne AW, White JO, Lalani EN. The endometrium and embryo implantation. A receptive endometrium depends on more than hormonal influences. *BMJ*. 2000; 321:1301-1302.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. 2017; 108:393-406.
3. Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod*. 1999; 14:515-520.
4. Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR, et al. Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:4991-5000.

5. Simon C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78:847-854.
6. Koot YE, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822:1943-1950.
7. Sharma A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *J Hum Reprod Sci.* 2012; 5:2-6.
8. Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat.* 1956; 98:435-493.
9. Morris JE, Potter SW. A comparison of developmental changes in surface charge in mouse blastocysts and uterine epithelium using DEAE beads and dextran sulfate in vitro. *Dev Biol.* 1984; 103:190-199.
10. Murphy CR, Rogers AW. Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus. III. The surface carbohydrates at the apex of the luminal epithelium. *Cell Biophys.* 1981; 3:305-320.
11. Murphy CR. The plasma membrane of uterine epithelial cells: structure and histochemistry. *Prog Histochem Cytochem.* 1993; 27:1-66.
12. Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod.* 1975; 12:41-65.
13. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* 1997; 2:84-93.
14. Kirn-Safran CB, Carson DD. Dynamics of uterine glycoconjugate expression and function. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999; 17:217-227.
15. Lessey BA. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod.* 1998; 13 Suppl 3:247-258; discussion 259-261.
16. Albers A, Thie M, Hohn HP, Denker HW. Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during the menstrual cycle. *Acta Anat (Basel).* 1995; 153:12-19.
17. Murphy CR. The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum Reprod Update.* 1995; 1:567-580.
18. Nikas G. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod.* 1999; 14 Suppl 2:37-44.
19. Rogers PA, Murphy CR. Morphometric and freeze fracture studies of human endometrium during the peri-implantation period. *Reprod Fertil Dev.* 1992; 4:265-269.
20. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* 2003; 299:405-408.
21. Carson DD, DeSouza MM, Regisford EG. Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. *Bioessays.* 1998; 20:577-583.
22. Fukuda MN, Nozawa S. Trophinin, tastin, and bystin: a complex mediating unique attachment between trophoblastic and endometrial epithelial cells at their respective apical cell membranes. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999; 17:229-234.
23. Aplin JD. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. *Hum Reprod.* 1999; 14 Suppl 2:17-25.
24. Aplin JD, Hey NA, Graham RA. Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology.* 1998; 8:269-276.
25. Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod.* 2000; 62:1285-1290.
26. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril.* 1994; 62:497-506.

27. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest.* 1992; 90:188-195.
28. Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 1992; 7:876-882.
29. Suzuki N, Nakayama J, Shih IM, Aoki D, Nozawa S, Fukuda MN. Expression of trophinin, tasin, and bystin by trophoblast and endometrial cells in human placenta. *Biol Reprod.* 1999; 60:621-627.
30. Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet.* 1997; 21:44-54.
31. Martin KL, Barlow DH, Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod.* 1998; 13:1645-1652.
32. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:11408-11412.
33. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:3115-3120.
34. Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014:201514.
35. Sengupta J, Lalitkumar PG, Najwa AR, Ghosh D. Monoclonal anti-leukemia inhibitory factor antibody inhibits blastocyst implantation in the rhesus monkey. *Contraception.* 2006; 74:419-425.
36. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, et al. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod.* 1995; 10:1208-1213.
37. Potts M, Psychoyos A. [Evolution of the ultrastructure of the ovoendometrial connections under the influence of estrogen in the rat during experimental retardation of nidation]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1967; 264:370-373.
38. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat.* 1973; 138:277-299.
39. Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update.* 2007; 13:77-86.
40. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; 270:467-470.
41. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology.* 2002; 143:2119-2138.
42. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, et al. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod.* 2005; 20:2104-2117.
43. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10:879-893.
44. Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:253-264.
45. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57:339-355.

46. Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci.* 2002; 7:d1879-1898.
47. Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:19-33.
48. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, et al. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8:871-879.
49. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod.* 2009; 24:198-205.
50. Friedman Y, Balaga O, Linial M. Working together: combinatorial regulation by microRNAs. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 774:317-337.
51. Tapia A, Gangi LM, Zegers-Hochschild F, Balmaceda J, Pommer R, Trejo L, et al. Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy. *Hum Reprod.* 2008; 23:340-351.
52. Kemmeren P, van Berkum NL, Vilo J, Bijma T, Donders R, Brazma A, et al. Protein interaction verification and functional annotation by integrated analysis of genome-scale data. *Mol Cell.* 2002; 9:1133-1143.
53. Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62:4427-4433.
54. Lessey BA, Kim JJ. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertil Steril.* 2017; 108:19-27.
55. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Gomez E, Fernandez-Sanchez M, Carranza F, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2013; 100:818-824.
56. Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J Hum Reprod Sci.* 2015; 8:121-129.
57. Garrido-Gomez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simon C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril.* 2013; 99:1078-1085.
58. Merrick WC. Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *J Biol Chem.* 2010; 285:21197-21201.
59. Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. *Biochem J.* 1990; 270:281-289.
60. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet.* 2004; 36:40-45.
61. Moazed D, Noller HF. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell.* 1989; 57:585-597.
62. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci.* 2002; 11:2067-2079.
63. Sharp SJ, Schaack J, Cooley L, Burke DJ, Soll D. Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes. *CRC Crit Rev Biochem.* 1985; 19:107-144.
64. Maraia RJ, Arimbasseri AG. Factors That Shape Eukaryotic tRNAomes: Processing, Modification and Anticodon-Codon Use. *Biomolecules.* 2017; 7.
65. Moreno-Moya JM, Vilella F, Simon C. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril.* 2014; 101:1516-1523.
66. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75:843-854.



67. Xu YW, Wang B, Ding CH, Li T, Gu F, Zhou C. Differentially expressed microRNAs in human oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28:559-566.
68. Li Y, Fang Y, Liu Y, Yang X. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *J Ovarian Res.* 2015; 8:51.
69. Suh N, Blelloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development.* 2011; 138:1653-1661.
70. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 2007; 39:380-385.
71. Spruce T, Pernaute B, Di-Gregorio A, Cobb BS, Merkenschlager M, Manzanares M, et al. An early developmental role for miRNAs in the maintenance of extraembryonic stem cells in the mouse embryo. *Dev Cell.* 2010; 19:207-219.
72. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003; 17:3011-3016.
73. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006; 71:59-66.
74. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005; 123:631-640.
75. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005; 436:740-744.
76. Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:16230-16235.
77. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116:281-297.
78. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223:102-115.
79. Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15:625-631.
80. Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2008; 110:206-215.
81. Altmae S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci.* 2013; 20:308-317.
82. Estella C, Herrer I, Moreno-Moya JM, Quinonero A, Martinez S, Pellicer A, et al. miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization in vitro. *PLoS One.* 2012; 7:e41080.
83. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2013; 88:130.
84. Dominguez F, Moreno-Moya JM, Lozoya T, Romero A, Martinez S, Monterde M, et al. Embryonic miRNA profiles of normal and ectopic pregnancies. *PLoS One.* 2014; 9:e102185.
85. Riffo-Campos AL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int J Mol Sci.* 2016; 17.
86. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005; 438:685-689.
87. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA.* 2010; 16:2043-2050.
88. Thomson DW, Bracken CP, Szubert JM, Goodall GJ. On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. *PLoS One.* 2013; 8:e55214.
89. Clement T, Salone V, Rederstorff M. Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA function. *Methods Mol Biol.* 2015; 1296:187-198.



90. Alvarez ML. Faster experimental validation of microRNA targets using cold fusion cloning and a dual firefly-Renilla luciferase reporter assay. *Methods Mol Biol.* 2014; 1182:227-243.
91. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One.* 2011; 6:e20769.
92. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010; 101:2087-2092.
93. Tsochandaridis M, Nasca L, Toga C, Levy-Mozziconacci A. Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:294954.
94. Fu G, Brkic J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:5519-5544.
95. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015; 13:17-24.
96. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:5003-5008.
97. Ludwig N, Becker M, Schumann T, Speer T, Fehlmann T, Keller A, et al. Bias in recent miRBase annotations potentially associated with RNA quality issues. *Sci Rep.* 2017; 7:5162.
98. Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AE, Devor E, Christenson L, Van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril.* 2013; 99:855-861 e853.
99. Ohnishi Y, Totoki Y, Toyoda A, Watanabe T, Yamamoto Y, Tokunaga K, et al. Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:5141-5151.
100. Parchem RJ, Moore N, Fish JL, Parchem JG, Braga TT, Shenoy A, et al. miR-302 Is Required for Timing of Neural Differentiation, Neural Tube Closure, and Embryonic Viability. *Cell Rep.* 2015; 12:760-773.
101. Wang R, Hu Y, Song G, Hao CJ, Cui Y, Xia HF, et al. MiR-206 regulates neural cells proliferation and apoptosis via Otx2. *Cell Physiol Biochem.* 2012; 29:381-390.
102. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci.* 2010; 28:589-603.
103. Rao J, Pfeiffer MJ, Frank S, Adachi K, Piccini I, Quaranta R, et al. Stepwise Clearance of Repressive Roadblocks Drives Cardiac Induction in Human ESCs. *Cell Stem Cell.* 2016; 18:341-353.
104. Tran ND, Kissner M, Subramanyam D, Parchem RJ, Laird DJ, Blueloch RH. A miR-372/let-7 Axis Regulates Human Germ Versus Somatic Cell Fates. *Stem Cells.* 2016; 34:1985-1991.
105. Rahkonen N, Stubb A, Malonzo M, Edelman S, Emani MR, Narva E, et al. Mature Let-7 miRNAs fine tune expression of LIN28B in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 2016; 17:498-503.
106. Qiu C, Ma Y, Wang J, Peng S, Huang Y. Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:1240-1248.
107. Zhang J, Ratanasirintrao S, Chandrasekaran S, Wu Z, Ficarro SB, Yu C, et al. LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2016; 19:66-80.
108. Cano A, Gomez R. Mir-661: A key Factor in Embryo-Maternal dialog With Potential Clinical Application to Predict Implantation Outcome? *EBioMedicine.* 2015; 2:1312-1313.
109. Cuman C, Van Sinderen M, Gantier MP, Rainczuk K, Sorby K, Rombauts L, et al. Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine.* 2015; 2:1528-1535.
110. Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci.* 2003; 94:655-667.

111. Xie L, Mouillet JF, Chu T, Parks WT, Sadovsky E, Knofler M, et al. C19MC microRNAs regulate the migration of human trophoblasts. *Endocrinology*. 2014; 155:4975-4985.
112. Ottolenghi C, Fellous M, Barbieri M, McElreavey K. Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of doublesex-related genes and the evolution of sex determination. *Genomics*. 2002; 79:333-343.
113. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet*. 2010; 19:3566-3582.
114. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer*. 2011; 104:1168-1177.
115. Kim N, Kim H, Jung I, Kim Y, Kim D, Han YM. Expression profiles of miRNAs in human embryonic stem cells during hepatocyte differentiation. *Hepatol Res*. 2011; 41:170-183.
116. Xu J, Zhang W, Lv Q, Zhu D. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN. *Oncol Rep*. 2015; 33:3108-3116.
117. Kong KY, Owens KS, Rogers JH, Mullenix J, Velu CS, Grimes HL, et al. MIR-23A microRNA cluster inhibits B-cell development. *Exp Hematol*. 2010; 38:629-640 e621.
118. Roy L, Bikorimana E, Lapid D, Choi H, Nguyen T, Dahl R. MiR-24 is required for hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS Genet*. 2015; 11:e1004959.
119. Mellios N, Huang HS, Grigorenko A, Rogaev E, Akbarian S. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Hum Mol Genet*. 2008; 17:3030-3042.
120. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:360-365.
121. Zhang H, Luo XQ, Zhang P, Huang LB, Zheng YS, Wu J, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS One*. 2009; 4:e7826.
122. Cekaite L, Clancy T, Sioud M. Increased miR-21 expression during human monocyte differentiation into DCs. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010; 2:818-828.
123. Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, Martinelli M, Lo Muzio L, Scarano A, et al. Anorganic bovine bone (Bio-Oss) regulates miRNA of osteoblast-like cells. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010; 30:83-87.
124. Lena AM, Mancini M, Rivetti di Val Cervo P, Saintigny G, Mahe C, Melino G, et al. MicroRNA-191 triggers keratinocytes senescence by SATB1 and CDK6 downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 423:509-514.
125. Yan SF, Pinsky DJ, Mackman N, Stern DM. Egr-1: is it always immediate and early? *J Clin Invest*. 2000; 105:553-554.
126. Pan X, Zhao J, Zhang WN, Li HY, Mu R, Zhou T, et al. Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:3788-3793.
127. Depamphilis ML, de Renty CM, Ullah Z, Lee CY. "The Octet": Eight Protein Kinases that Control Mammalian DNA Replication. *Front Physiol*. 2012; 3:368.
128. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Nganheu A, Taccioli C, Briskin D, et al. Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet*. 2013; 9:e1003311.
129. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*. 2008; 40:1478-1483.
130. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*. 2009; 27:459-461.

131. Li R, Qiao J, Wang L, Li L, Zhen X, Liu P, et al. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9:29.
132. Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, et al. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells*. 2008; 26:2496-2505.
133. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:443-448.
134. Wang Y, Lv Y, Gao S, Zhang Y, Sun J, Gong C, et al. MicroRNA Profiles in Spontaneous Decidualized Menstrual Endometrium and Early Pregnancy Decidua with Successfully Implanted Embryos. *PLoS One*. 2016; 11:e0143116.
135. Yang J, Chen L, Ding J, Fan Z, Li S, Wu H, et al. MicroRNA-24 inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting HMGB1. *Gene*. 2016; 586:268-273.
136. Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril*. 2014; 101:1493-1500.
137. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, et al. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:W273-276.

## 12.0 PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO

**Análisis de expresión diferencial de cuatro miRNAs en el medio de cultivo de embriones humanos en desarrollo.**

XVII Reunión Internacional de Ciencias Médicas.  
León, Guanajuato., 26 al 28 de abril, 2017.