



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 DEL EPITELIO ENDOMETRIAL HUMANO
EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON EL MIR-191-5p EMBRIONARIO**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA

RICARDO JOSUÉ ACUÑA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

**M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA**

COMITÉ TUTOR

Dr. Ricardo Figueroa Damián, Instituto Nacional de Perinatología “*Isidro Espinosa de los Reyes*”.

Dr. Carlos Zenteno Ruíz, Instituto de Oftalmología, Conde de Valenciana.

Ciudad Universitaria, Ciudad de México noviembre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

Página

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 El proceso de implantación.....	5
Figura 2 Expresión de miRNAs en medio de cultivo embrionario.....	4
Figura 3 Biogénesis y maduración de los miRNAs.....	10
Figura 4 Expresión de los pequeños RNA no-codificantes en diferentes estados de desarrollo embrionario.....	12
Figura 5 Factores endometriales y embrionarios asociados con la ventana de implantación	19
Figura 6 Reducción del MTT por las hidrogenetasas endometriales.....	29
Figura 7 Morfología y viabilidad de las células RL95-2 endometriales de humano	32
Figura 8 Modulación de miRNAs en las células RL95-2 estimuladas Con el agomiR-191	35
Figura 9 Efecto de dosis y tiempo	38
Figura 10 Regulación de miRNA-mRNA	39
Figura 11	40
Figura 12	41
Figura 13	43
Figura 14	44
Figura 15	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Identificación de las muestras de RNA del medio de cultivo	31
Tabla 2 Tasa de cambio de miRNAs	37
1.0 INTRODUCCION	6
2.0 ANTECEDENTES	8
2.1 <i>La implantación embrionaria afecta la tasa de embarazo</i>	8
2.2 <i>El universo del RNA</i>	9
2.2.1 <i>Los miRNAs estructura y función</i>	9
2.3 <i>Los RNAs pequeños en el embrión y la línea germinal</i>	11
2.4 <i>Los miRNAs en la diferenciación del trofoectodermo</i>	14
2.4.1 <i>Los miRNAs en la regulación de la adhesividad embrionaria</i>	16
2.5 <i>Los miRNAs en el desarrollo y diferenciación embrionaria</i>	18
2.5.1 <i>Función del miR-191-5p en el desarrollo y diferenciación</i>	18
2.6 <i>Receptividad uterina</i>	19
2.6.1 <i>Análisis de expresión de genes asociados a la receptividad uterina</i>	21
2.6.2 <i>La herramienta ERA</i>	23
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24

4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
5.0 JUSTIFICACIÓN	25
6.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos particulares.....	26
6.3 Hipótesis.....	27
7.0 MATERIAL Y METODOS.....	27
7.1 <i>Diseño del estudio</i>	27
7.2 <i>Características de la línea celular</i>	28
7.2.1 <i>Establecimiento de la línea celular RL95</i>	27
7.3 <i>Transfección de la línea celular RL95-2</i>	28
7.4 <i>Obtención del RNA</i>	29
7.5 <i>Secuenciación masiva de los miRNAs y análisis bioinformático</i>	30
8.0 RESULTADOS.....	32
8.1 <i>Establecimiento de la línea celular</i>	32
8.2 <i>Perfil de expresión de los miRNAs en el medio de cultivo celular</i>	33
8.3 <i>Secuenciación de RNAs pequeños</i>	33

8.4 <i>Expresión diferencial de miRNAs en células tratadas</i>	35
8.5 <i>Blancos moleculares de los miRNAs que modificaron su expresión</i>	35
9 <i>Discusión</i>	49
9.1 <i>miRNAs con incremento de expresión</i>	50
9.2 <i>miRNAs con disminución de expresión</i>	56
10 <i>Conclusiones</i>	59
9.0 BIBLIOGRAFÍA	60

1. INTRODUCCIÓN

La implantación embrionaria es un evento crítico para el establecimiento de un embarazo viable, la cual ocurre cuando un blastocisto maduro y competente localizado en la cavidad uterina se adhiere al endometrio receptivo e invade el estroma (Fig. 1). Se ha postulado que la sincronía entre el embrión-endometrio es un elemento crucial para la consecución del embarazo. (1)

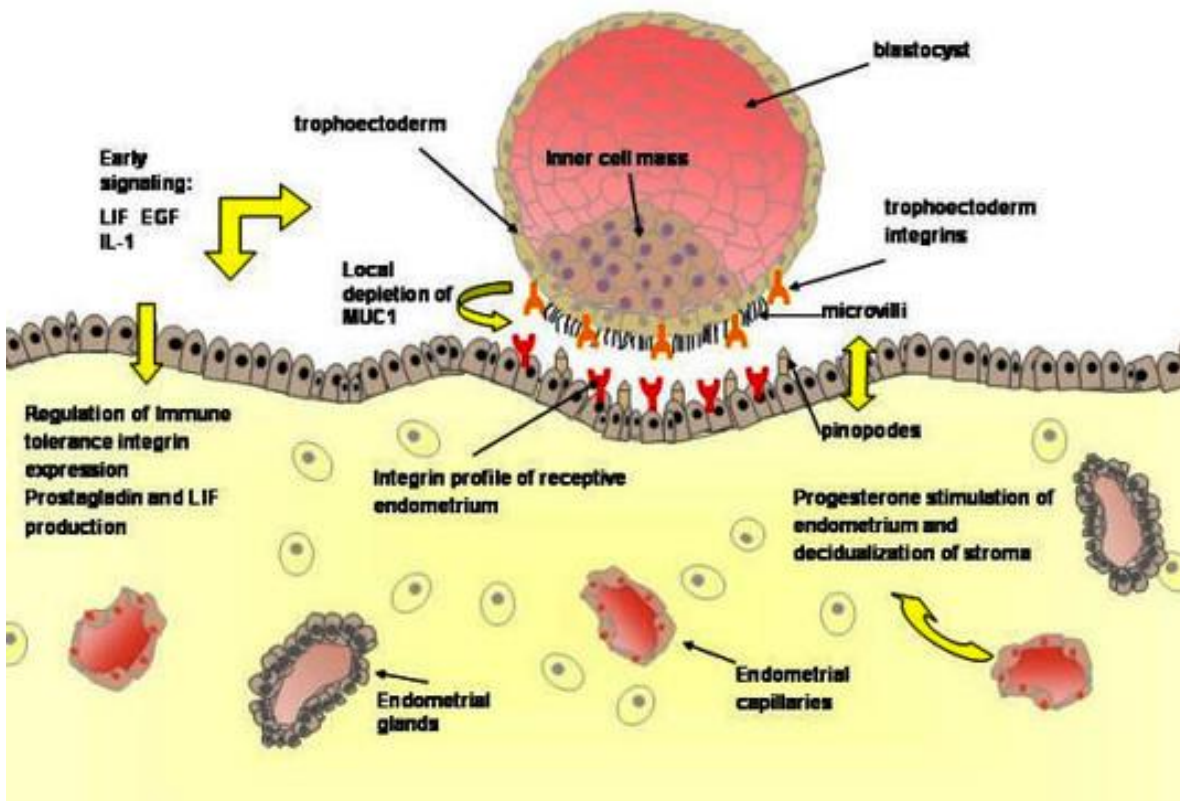


Figura 1 El proceso de implantación involucra un intercambio de información molecular que es poco conocido. Entre los fenómenos mejor estudiados se encuentra la expresión de moléculas de adhesión y la formación de proyecciones denominadas pinópodos en el epitelio endometrial. La figura fue modificada de Elsebeth Staun-Ram (2)

Los fenómenos de decidualización del epitelio endometrial, así como el desarrollo de la capacidad adherente del trofoectodermio han sido evaluados de forma aislada;

sin embargo, existen pocos estudios que describan la comunicación molecular entre el endometrio y el embrión, y la información es aún más escasa tratándose de la interacción previa a la implantación en humanos. (3)

Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos comparado el perfil de expresión de cuatro miRNAs en el medio de cultivo de embriones humanos del 5to día de desarrollo y que fueron transferidos a las pacientes sometidas a fertilización *in vitro* (Fig. 2). En las pacientes con evidencia clínica de implantación (saco gestacional en el ultrasonido) encontramos que el miR-191-5p aumentó significativamente 5.2-veces su expresión con respecto a los embriones no-implantados ($p \leq 0.001$), en tanto que el miR-24-1-5p disminuyó significativamente su expresión 1.6-veces ($p = 0.043$), lo cual es consistente con estudios previos. (4)

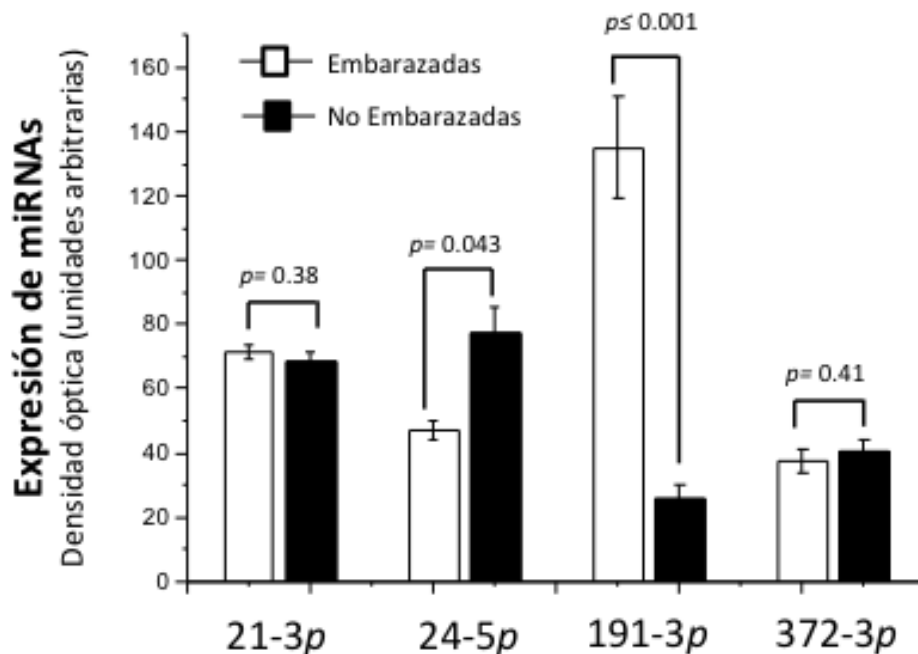


Figura 2 Expresión de los miRNAs de embriones humanos en desarrollo. Se muestra la densidad óptica de expresión entre las pacientes embarazadas y no-embarazadas. La expresión de los hsa-miRNAs se realizó en el medio de cultivo. Los datos son mostrados como la media \pm desviación estándar. Se indica la diferencia significativa la cual fue realizada mediante la prueba de *t*-Student y se tomó como diferencia significativa un alfa $<$ a 0.05 (La imagen fue tomada de Acuña-González *et al.* (4))

En el miR-21-3p ($p = 0.38$) y miR-372-5p ($p = 0.41$) no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Fig. 2). Dichos hallazgos sugieren que el miR-191-5p podría constituir un mensajero bioquímico embrionario dirigido a la regulación en la expresión de miRNAs asociados a la receptividad a nivel endometrial.

Mediante ensayos de predicción *in-silico* se ha demostrado que el miR-191-5p y el miR-24-1-5p están implicados en la regulación de vías de señalización mediado por la MAP3K-1 así como de la proteína CDK6 asociada al ciclo celular y con vías de apoptosis. (5) Recientemente, Cuman y colaboradores (2015) determinaron en células trofoblásticas humanas (HTR-8/SVneo) transfectadas con el miR-661 embrionario la reducción en la expresión de las proteínas de adhesión nectina-1 (Poliovirus receptor-related 1; PVRL1), asociada a metástasis tipo 1 y 2 (MTA) y efrina de tipo B (ephrin type-B receptor 2; EPHB2) involucradas con la receptividad y adhesión endometrial los cuales fueron corroboradas por el análisis de expresión en biopsias endometriales de pacientes no embarazadas. (6)

2. ANTECEDENTES

2.1 La implantación embrionaria afecta la tasa de embarazo

La infertilidad es una patología que afecta alrededor del 15% de las parejas a nivel mundial. (7) Las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad son la modalidad terapéutica que ofrece mejores posibilidades de éxito; sin embargo, la eficiencia de las técnicas no es óptima, en gran parte esto se debe a casos de falla en la implantación, donde embriones de adecuada calidad morfológica son transferidos a la cavidad endometrial y el resultado es negativo. (8) La implantación embrionaria es uno de los eventos menos conocidos en la reproducción humana, la caracterización de los procesos biológicos y patológicos involucrados en este fenómeno podría facilitar la generación de estrategias diagnósticas y terapéuticas, lo que incrementaría la tasa de embarazo en pacientes sometidas a fertilización *in vitro*. (9)

Se han descrito algunas moléculas secretadas que participan en la comunicación entre el endometrio y el embrión, por ejemplo; los esteroides ováricos (10) citocinas como el Factor Inhibidor de Leucemia LIF, (11) el Factor de Crecimiento Epidérmico ligado a Heparina (HB-EGF) (12) y algunas glicoproteínas como la Osteopontina (OP); (10, 13) sin embargo, los mecanismos por los cuales influyen en la capacidad de implantación embrionaria son poco claros, o incluso desconocidos. (3)

Aunque cada una de estas moléculas está involucrada con vías de receptividad endometrial, estas son secretadas por tejidos de origen materno (endotelio, ovario, epitelio endometrial), y en la gran mayoría de los casos, se han evaluado en modelos animales (14). Recientemente se ha demostrado la existencia de miRNAs extracelulares en el fluido endometrial, y también en los medios de cultivo embrionario, indicando que ambos sintetizan y secretan activamente estas moléculas de RNA no codificante, y sugiere un posible papel en la comunicación endometrio-embrión en el momento previo a la implantación. (15)

2.2 El universo del RNA

El ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid, RNA por sus siglas en inglés) 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. (16)

El RNA puede formar estructuras con funciones diversas. Clásicamente se han descrito 3 tipos: a) RNA mensajero, que forma parte de un transcrito cuyo origen es el DNA (Deoxyribonucleic acid, DNA por sus siglas en inglés); b) el RNA ribosomal, que forma parte de los ribosomas, y c) el RNA de transferencia que participa en la traducción de los RNA mensajeros.

Por otro lado, existe una gran cantidad de moléculas de RNA que se denominan en su conjunto RNA no codificante, ya que no participan directamente en la traducción de proteínas, en función de su longitud se clasifican en: 1) RNA largos, (lncRNA) que miden más de 200 nucleótidos con funciones diversas como la inactivación del cromosoma X, la impronta y la regulación de la transcripción de otros genes (splicing); (17) y 2) RNA pequeños, los cuáles a su vez se subdividen en distintas subclases como los piwi-interacting RNAs (piRNAs); (18) small interfering RNA (siRNAs); (19) y microRNAs (miRNAs). (20)

2.2.1 Los miRNAs estructura y función

Los miRNAs son una clase particular de RNA pequeños, que miden en promedio 22 nucleótidos de longitud y se sintetizan a partir de un transcrito primario de alrededor de 1500 nucleótidos (pri-miRNA), éste transcrito sufre una primera edición intranuclear mediada por la RNAsa Drosha (21) y una segunda edición citoplásmica mediada por la RNAsa Dicer (Fig. 3). (22) El miRNA maduro, producto de la edición del transcrito primario contiene una secuencia inicial en su extremo 5' de 6-8 nucleótidos que constituye la "semilla" (23) y brinda especificidad de unión con sus blancos moleculares, los RNA mensajeros, con quienes encuentra

complementariedad en la región 3' no traducida (3' UTR). Dicha unión tiene lugar en un complejo proteico denominado RISC (RNA mediated Silencing Complex) (24) en donde miembros de la familia de proteínas Argonata (Ago) facilitan el silenciamiento del mRNA, (25) inhibiendo la traducción de la proteína codificada en el mensajero. (26) La disminución en las concentraciones de los blancos moleculares desencadena respuestas biológicas diversas.

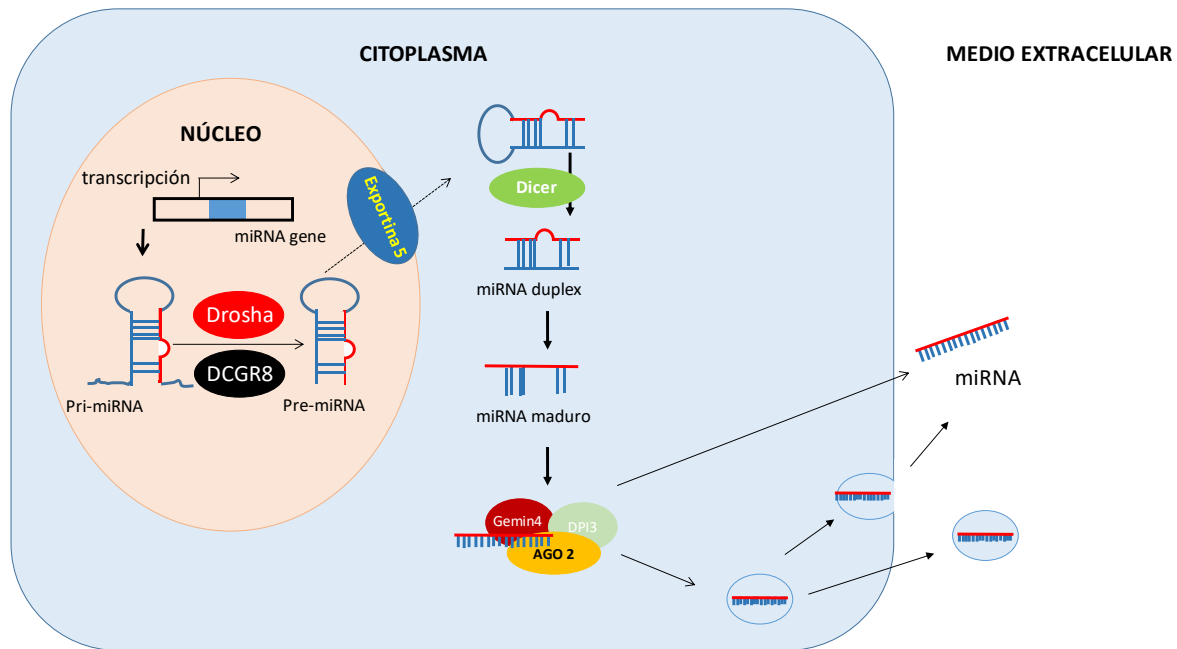


Figura 3 Biogénesis y maduración de los miRNAs. El proceso se inicia en el núcleo al activarse las secuencias genéticas del miRNA activado mediante la RNA polimerasa de tipo II (transcripción) generando el transcrito primario (pri-miRNA) el cual es procesado por el complejo de Drosha (RNAsa III) y la proteína DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region gene) y forman un complejo llamado microprocesador como se muestra en la figura. Drosha, a través de su dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD) reconoce el sustrato del pri-miRNA, y mediante sus dominios de RNAsa III (RIIIds a-b) escinde las cadenas laterales del pri-miRNA para formar un pre-miRNA que será exportado del núcleo al citoplasma por la exportina 5. 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 argonata 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 las 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 la helicasa.

Los miRNAs maduros son secretados al medio extracelular mediante diversos mecanismos como son: exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos, lipoproteínas de alta densidad y complejos proteicos (27) una vez en el medio extracelular los miRNAs se mantienen estables lo que permite un análisis no-invasivo. (28, 29) Los miRNAs circulantes pueden modular tejidos distantes, (30) este fenómeno se ha descrito incluso en la regulación de proteínas asociadas a receptividad endometrial mediada por miRNAs embrionarios.(4) Existen evidencias científicas que demuestran que algunos tipos de comunicación intercelular son mediados por los miRNAs los cuales se expresan en diferentes etapas del desarrollo embrionario, (31) y en la implantación. (32)

Matkovich y colaboradores (2013) han descrito la regulación de miRNAs mediada por miRNAs en el tejido cardiovascular mediante la construcción de modelos transgénicos que sobre-expresan miR-143, -378 y -499 y demostrando mediante análisis de genoma completo que el miR-378 y miR-499 regulan indirectamente la transcripción de 15 a 30 miRNAs cardiovasculares, lo cual explica, en parte, como se amplifican pequeños efectos de los miRNAs para generar fenotipos notables. (33)

2.3 Los RNAs pequeños en el embrión y la línea germinal.

Los RNAs pequeños no codificantes desempeñan un papel fundamental en la gametogénesis y el desarrollo embrionario temprano. (34) Se sabe que existe una transición en la expresión de estas moléculas, desde siRNAs y piRNAs en la línea germinal, hacia una producción fundamentalmente de miRNAs en el tercer día del desarrollo embrionario. (35)

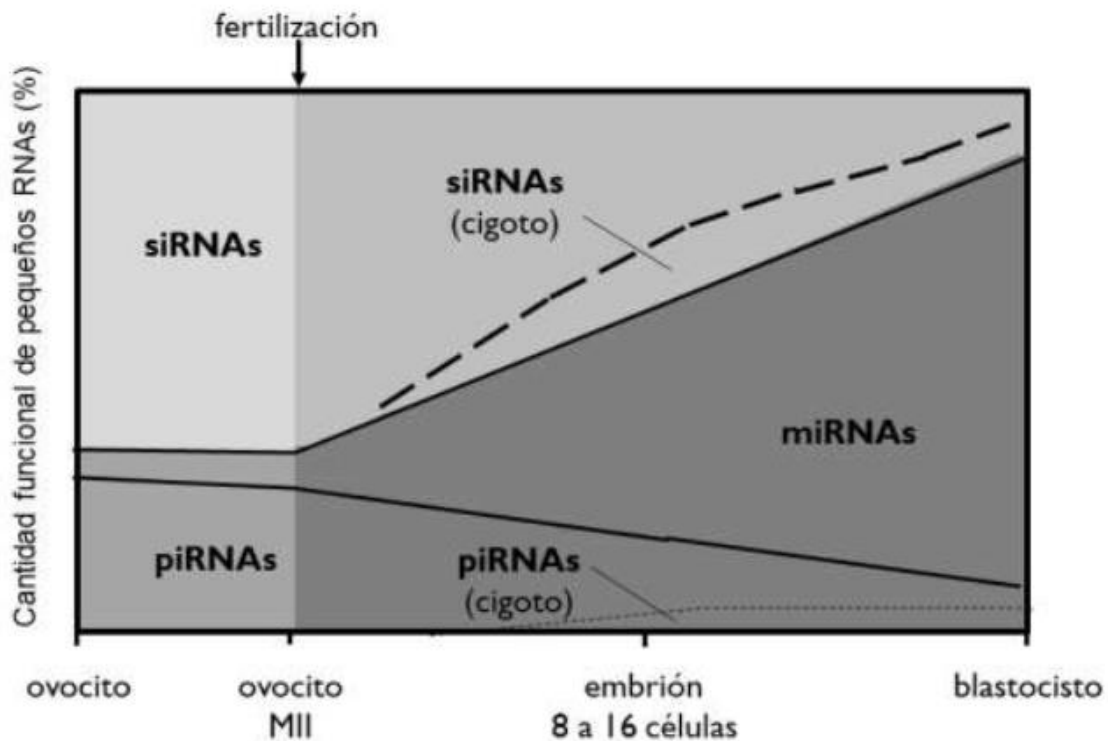


Figura 4 Expresión de los pequeños RNA no-codificantes en diferentes estados de desarrollo. En el estadio pre-embionario (ovocito-ovocitos MII), la línea germinal femenina, presenta en el mayor porcentaje la expresión de RNA pequeños no codificantes corresponde a siRNAs y piRNAs, lo cual tiene un sentido 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 fue adaptada de Ohnishi y colaboradores. (35)

Los piRNAs son RNA's pequeños de alrededor de 30 nucleotidos (nt) de longitud que están asociados a proteínas de la familia PIWI y son prácticamente específicos de la línea germinal, actúan protegiendo la integridad del genoma en periodos de hipometilación, silenciando elementos genéticos móviles potencialmente dañinos. (36) Los siRNAs (RNA's pequeños de interferencia) tienen funciones más allá de la línea germinal, pero se expresan fundamentalmente en el desarrollo embrionario

temprano manteniendo el estado de pluripotencia en el cigoto, al tiempo que ejercen un silenciamiento de retrotransposones LINE1. (37)

Por otro lado, la expresión de miRNAs comienza hacia el segundo día de desarrollo embrionario cuando las marcas epigenéticas han restaurado la estabilidad genómica mediante metilación del DNA y la expresión de los elementos genéticos móviles está controlada. (35) La expresión de los miRNAs está relacionada con fenómenos de regulación de la pluripotencia y reprogramación celular, así como en la diferenciación temprana. (38) Reportes recientes sugieren que el desarrollo embrionario se acompaña de modificaciones dinámicas en la expresión de miRNAs.

Utilizando el modelo de nemátodo se ha demostrado que en *Caenorhabditis elegans*, los miRNAs *lin-4* (39, 40) y *let-7* son críticos para el control temporal del desarrollo larvario. (41) Estudios en el pez *cebra* demuestran fuerte expresión de miRNAs durante y después de la segmentación; la mayoría de estos miRNAs muestran una especificidad tisular sorprendente. (42) Así mismo, en el desarrollo embrionario murino se presenta una regulación temporal en la expresión de miRNAs entre los días 5.5 y 11.5. (43) Las células madre embrionarias (ESC, Embryonic Stem Cells, por sus siglas en inglés) expresan relativamente pocos miRNAs, pero existe un incremento global en su expresión en el momento de su diferenciación hacia cuerpos embrioides. (43) También se ha descrito un clúster de miRNAs específicos de Células Madre Embrionarias (ESC) que se encuentra reprimido hasta el momento de la formación de los cuerpos embrioides. (44) La inactivación genética de las vías de biosíntesis de miRNAs prácticamente anula la capacidad de las ESC para diferenciarse, dicha observación fortalece la noción de que estos cambios en la expresión de miRNAs tienen una función esencial en el desarrollo embrionario temprano. (45, 46) A continuación, se detallan algunas de las relaciones entre miRNAs y vías morfogénicas más estudiadas en el desarrollo embrionario.

2.4. Los miRNAs en la diferenciación del trofoectodermo.

Hacia el estadio embrionario de 8 células, las blastómeras son totipotenciales y mantienen la capacidad de contribuir a todos los linajes celulares embrionarios y extraembrionarios. (47, 48) En el estadio de 8 células tardío, las blastómeras incrementan los contactos intercelulares para formar una mórula compacta; en este momento las blastómeras adquieren una polarización apical-basal, (49) las subsecuentes divisiones celulares asimétricas producen dos distintas poblaciones celulares: una externa en contacto con el medio ambiente, y una interna completamente rodeada de células externas. La segregación del trofoectodermo (TE) de las células de la masa celular interna (ICM: Inner Cell Mass, por sus siglas en inglés) constituye la primera etapa de diferenciación embrionaria en los mamíferos. (50) A medida que progresa el desarrollo, el trofoectodermo se epiteliza y sus derivados formarán el componente fetal de la placenta. Las células de la masa celular interna, (ICM, Inner Cell Mass) se segregarán en dos poblaciones distintas: el epiblasto (formará todos los tejidos del embrión) y el endodermo primitivo, que origina el saco vitelino. (48)

Recientemente, se han identificado algunos factores de transcripción que funcionan como moduladores críticos de la segregación ICM/TE. **Oct4** (Octamer binding transcription factor 4) específico de la ICM, (51) mantiene la segregación, su inactivación genera embriones que desarrollan un trofoectodermo (TE) funcional, pero carecen de epiblasto y saco vitelino. (52) **Nanog** es un factor específico del epiblasto que actúa en concierto con Oct4 y podría bloquear la diferenciación hacia endodermo primitivo. (53) **Cdx2** (caudal type homeobox 2) es un factor del Trofoectodermo que es necesario para el desarrollo trofoectodérmico (54, 55) los embriones con inactivación de Cdx2 sufren apoptosis dentro del TE y presentan letalidad preimplantación. (55)

Existe evidencia que demuestra cambios dinámicos en la expresión de miRNAs durante la diferenciación trofoectodérmica, de forma notable, múltiples miembros de la familia let-7 de miRNAs cambiaron significativamente su expresión durante el

periodo de diferenciación, lo cual se ha asociado a estados de diferenciación en otros contextos, (56) estos miRNAs de la familia let-7 se encuentran dispersos en distintos loci pero tienden a expresarse de forma coordinada para regular ciertos procesos del desarrollo embrionario. (57-60)

El miRNA-24 también sufre una inducción importante durante la diferenciación trofoectodérmica, este contiene una secuencia de complementariedad perfecta en la semilla con la región no traducida 3' de Cdx2 (además de ser esta proteína un blanco detectado en las herramientas TargetScan, Pic Tar, y miRTIF), lo cual sugiere que miR-24 podría contribuir a la represión de Cdx2 en este contexto, (61) ya que los niveles de Cdx2 van disminuyendo a medida que la diferenciación trofoectodérmica progresa.

Los miRNAs que presentan expresión diferencial en el blastocisto con respecto al estadio de mórula son el miR-21, -29c, -96, -125a, -214, -297, -424, y además de let-7 incrementan su expresión significativamente conforme progresa la diferenciación. Estos miRNAs también se han asociado a otros procesos de diferenciación, por ejemplo miR-21 incrementa durante la diferenciación de la línea celular de leucemia HL-60, (62) y además suprime al factor de transcripción REST que mantiene la auto-renovación y pluripotencia celular, (63) la familia let-7 está fuertemente asociada con la diferenciación en múltiples escenarios, (56) miR-214 se ha implicado en la diferenciación de células musculares al modular la señalización Hedgehog, (64) miR-125 es fuertemente inducido en la diferenciación neural de las células de carcinoma embrionario, (65) y podría estar involucrado en un asa de retroalimentación en el neurodesarrollo mediante el reclutamiento de las células madre neurales. (59) El miR-424 que es el que demuestra el mayor aumento en su expresión hacia el estadio de blastocisto, estimula el programa de diferenciación monocito-macrófago. (66) El miRNA que muestra disminución consistente en su expresión es el miR-376-a, (60) un miRNA localizado en un gran clúster improntado de miRNAs específico de los mamíferos placentarios. (67) Los blancos moleculares de estos miRNAs con expresión diferencial muestran una clara regulación de las vías mediadas por proteínas Ras, (Rat Sarcoma) que son un

conjunto de interruptores-reguladores moleculares en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos: integridad del citoesqueleto; proliferación, diferenciación, adhesión y migración, y apoptosis, y la vía MAPK/p38, (Mitogen Activated protein Kinases/p38), que regula la diferenciación, apoptosis y autofagia en respuesta a distintos tipos de estrés celular, lo cual es congruente con la noción de que la diferenciación trofoectodérmica esta especificada por la señalización RAS-MAPK. (68) Además, estos miRNAs de expresión diferencial regulan, mediante ciertos blancos moleculares, la vía de señalización de integrinas, lo cual es consistente con el papel central de la señalización mediada por contacto en la especificación del trofoectodermo y la implantación. (2)

Por otro lado, también se han descrito miRNAs altamente específicos de las Células Madre Embrionarias y que están fuertemente relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia, (2) en particular el clúster miR-302, el miR-290 y el clúster miR-17/92, mismos que tienden a disminuir su expresión a medida que el trofoectodermo se especializa.

2.4.1 Los miRNAs en la regulación de la adhesividad embrionaria.

La implantación requiere la invasión del trofoblasto dentro de la decidua y miometrio interno para establecer el intercambio feto-materno y la tolerancia inmunológica del aloinjerto feto-placentario. Las células trofoblásticas se diferencian en trofoblasto veloso y trofoblasto extraveloso, este último tejido es el que presenta capacidad de invasión en la decidua y miometrio maternos.

El clúster más grande de miRNAs en la especie humana es el C19MC, (Chromosome 19 miRNA Cluster) es específico de los primates y se expresa casi exclusivamente en la placenta, células madre (69, 70) y en algunos adenocarcinomas endocrinos y hepáticos. (71, 72) La expresión de miRNAs del clúster C19MC es mucho mayor en las células del trofoblasto veloso respecto al

trofoblasto extraveloso, lo que sugiere que miRNAs de este clúster favorecen vías de diferenciación y especialización en este tejido, mientras que el trofoblasto extraveloso permanece en un estado de diferenciación más primitivo, lo que le confiere la capacidad de invasión, migración y proliferación. El incremento en la expresión del clúster C19MC mediante transfección de plásmidos bacterianos atenúa la migración trofoblástica a través de la interacción con una red de enzimas y proteínas que regulan la motilidad. (73)

La expresión de los miRNAs del clúster C19MC en el trofoectodermo se relaciona con la especialización del tejido hacia una placenta madura, se ha demostrado que su expresión incrementa significativamente en el trofoblasto desde el primero hasta el tercer trimestre, de igual manera, los miRNAs del clúster miR-371-3 (también localizado en el cromosoma 19) incrementan ligeramente su expresión a lo largo del embarazo. (74) Los miRNAs del clúster C19MC también se encuentran en abundancia dentro de vesículas derivadas de trofoblastos, incluyendo exosomas, (75) lo que sugiere una función en la señalización materno-placentaria, (76) también se ha demostrado que el contenido de los exosomas trofoblásticos ricos en miRNAs del clúster C19MC, confiere resistencia viral a células receptoras. (77) Algunos de los blancos moleculares comunes a los miRNAs representativos del clúster C19MC (517-3p, 518b, -519d, 520g, 515-5p, -1323) tienen funciones relacionadas con la motilidad, migración o invasividad celular. (73)

El miRNA-155 inhibe la proliferación y migración del trofoblasto extraveloso, mediante la inhibición de la traducción de Ciclina D1. La expresión inducida de miR-155 en células del trofoblasto extraveloso disminuye la proliferación celular e invasividad, además el miR-155 regula los niveles de la proteína cinasa inhibidora dependiente de ciclinas p27, y la proteína citoesquelética filamina A. (78) La vía ciclina D1/p27 está directamente involucrada en la transición del ciclo celular de la fase S a la G1.

2.5 Los miRNAs en el desarrollo y diferenciación embrionaria.

2.5.1 Función del miR-191-5p en el desarrollo y la diferenciación.

La expresión del miR-191-5p muestra una disminución significativa a medida que incrementa la edad de los individuos en la corteza prefrontal analizada post-mortem, se ha propuesto que la regulación del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor BDNF) un blanco de miR-191 podría contribuir al desarrollo cortical. (79) Así mismo, su expresión incrementa 2-5 veces en cultivos neurales de rata, lo cual sugiere un papel en el desarrollo neuronal. (80)

Los incrementos en la expresión de miR-191-5p se han asociado también con la senescencia replicativa, además inhibe la proliferación en cultivos primarios de queratinocitos, actuando a través de sus blancos moleculares SATB1 y CDK6. (81) El miR-191-5p exhibe un patrón de expresión circadiano en el hepatocito murino, con una relación inversa a los niveles de expresión de Bma-1, un factor de transcripción circadiano. (82)

El miR-191-5p también tiene funciones en la diferenciación celular, en la línea de diferenciación eritroide, miR-191 disminuye significativamente su expresión en el estadio CFU-E a Ter119+, mientras que el incremento en su expresión inhibió la enucleación eritroide y la condensación de la cromatina, lo cual sugiere que miR-191-5p juega un papel crucial en la eritropoyesis, mediante sus blancos Rik3 y Mxi1. (83) De la misma forma, en células dendríticas derivadas de monocitos, el miR-191 se encuentra disminuido con respecto a monocitos no diferenciados. (84)

En estudios de regeneración ósea, se ha encontrado que miR-191-5p incrementa su expresión en la línea celular de osteoblastos MG63 expuestas a un regenerador óseo (Bio Oss), donde disminuye la expresión de algunos genes homeóticos como noggin y EN1. (85)

2.6 Receptividad uterina

El concepto de receptividad uterina se refiere a la capacidad del endometrio para permitir la implantación de un embrión en desarrollo, la cual ocurre mediante

complejas interacciones divididas en 3 estadios: aposición, adhesión, e invasión (Fig. 5).

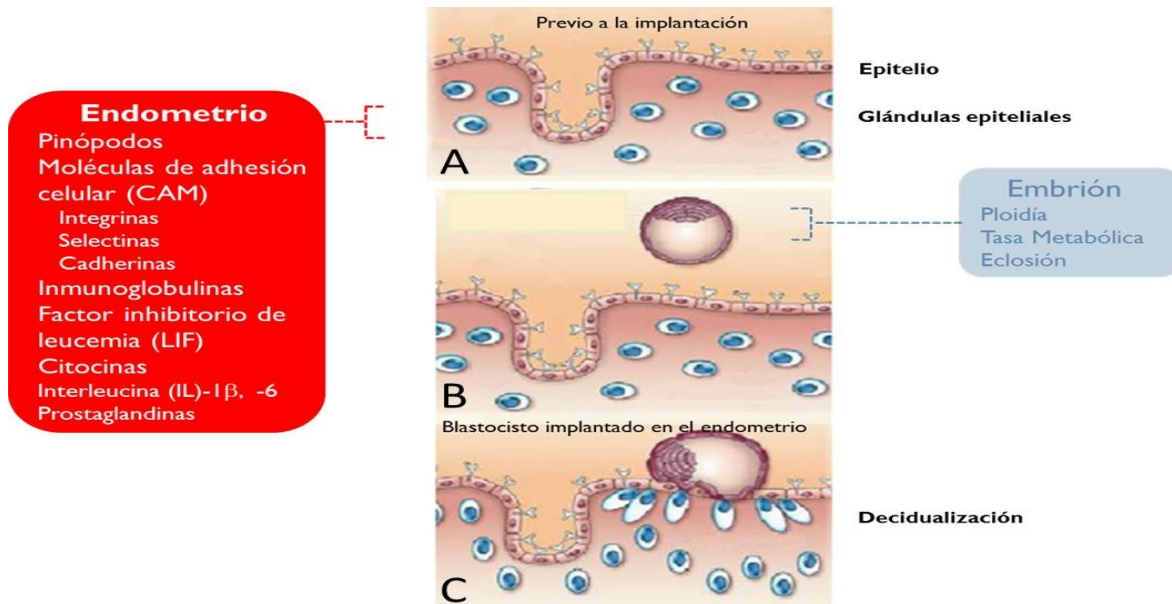


FIGURA 5 Factores endometriales y embrionarios asociados con la ventana de implantación. Previo a la implantación se promueve en el endometrio el desarrollo de proyecciones en el epitelio celular (pinópodos), (86, 87) aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular (α V β 3 integrina, e-cadherina), (86, 88) y moléculas asociadas con la respuesta inflamatoria. (10) **(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 modificada de Koot y colaboradores (89)

El proceso de receptividad uterina e implantación se presenta durante una ventana reducida de tiempo, descrito por primera vez en modelos experimentales. (90) Este hallazgo motivó diversas estrategias para su búsqueda en el humano, determinando que esta ventana de implantación (88) está comprendida entre el 5o y el 6o día después de la ovulación, (91) periodo que coincide con el incremento de progesterona plasmática. (92) En éste periodo se ha observado en la superficie de las células endometriales la disminución en el grosor del glicocálix, (93) y en su carga electrostática (92, 94) así como cambios morfológicos en las microvellosidades epiteliales generando grandes áreas aplanadas en la superficie. (86, 95, 96)

Se ha reportado la biosíntesis de proteínas de superficie de tipo integrinas localizadas principalmente en el dominio apical (Fig. 5) (86, 88) y basolateral (97, 98) además de moléculas que contribuyen a la adhesión del trofoectodermo al epitelio endometrial como los ligandos de selectina, mientras que el trofoectodermo humano expresa Selectina, estableciendo un sistema altamente coordinado entre ligando-receptor. (99)

Otras moléculas involucradas son el heparán sulfato, (100, 101) la proteína MUC1 (Mucin-1 Cell surface associated; por sus siglas en inglés) (93, 102) y las integrinas $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ y $\alpha 5 \beta$, involucradas en estadios tempranos de la ventana de implantación. (44)

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 (rbBs) en el embrión y el endometrio durante el periodo preimplantación, sugieren que estos factores de crecimiento podrían estar regulando una interacción entre ellos. (103) Algunos de los miembros de esta familia expresados durante la ventana de implantación son el propio EGF, el factor transformador de crecimiento alfa, TGF- α , EGF de unión a heparina (HB-EGF) anfiregulina (Ar), β -celulina (BTC) epiregulina (Er) y Herregulina (HRG). (104) HB-EGF se expresa durante la ventana de implantación y también estimula el desarrollo de embriones humanos generados mediante ciclos de fertilización *in vitro*. (104)

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 en el líquido endometrial (105, 106) y se ha propuesto como una molécula que estimula la implantación del blastocisto. (107) Lo anterior ha sido demostrado en modelos experimentales mediante la inyección intrauterina del anticuerpo monoclonal anti-LIF, que inhibe la implantación. (108)

A través del 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. (87) 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. (96)

2.6.1 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 en el endometrio durante el periodo de máxima receptividad (ventana de implantación), utilizando tecnología de microarreglos. (109) 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. (110) La evaluación de la expresión génica global ha permitido determinar perfiles de expresión de cada fase endometrial durante el ciclo menstrual. (111, 112) Dado que la adquisición de receptividad endometrial está fundamentalmente dirigida por la Progesterona, (113, 114) se han determinado patrones de expresión génica durante los ciclos menstruales espontáneos comparando perfiles de expresión endometrial bajo distintos niveles de Progesterona sérica: niveles pico de progesterona (días 19-23, ventana de implantación) (111, 115, 116) y bajo niveles muy bajos de progesterona (días 8-11, fase proliferativa) (117) o con niveles medios de Progesterona en días 14-16 del ciclo menstrual, cercano a la fase de ovulación, dos días después del pico de Hormona luteinizante (LH+2). (118)

Los estudios de microarreglos han determinado expresión diferencial en al menos 63 transcritos entre mujeres con falla en la implantación comparadas con mujeres sanas, (119) de los cuales se pudieron identificar 14 genes coincidentes con los reportados en otros estudios, y al menos 4 de ellos están relacionadas con la regulación del sistema inmune. (120) De estos 14 genes, cinco están también disminuídos en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, 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). (121)

Recientemente se ha descrito una herramienta genómica que utiliza un microarreglo en conjunto con un predictor bioinformático para determinar ventana de implantación. Esta herramienta se denomina ERA (Endometrial Receptivity Array; por sus siglas en inglés). (118)

2.6.2 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. De acuerdo con la información obtenida acerca del aumento o disminución de los genes involucrados en la ventana de implantación, Horcajadas y colaboradores (109) 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. El arrreglo de receptividad endometrial (ERA por sus siglas en inglés) consiste en 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. (122) 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. (123)

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. 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. (124) Las muestras para análisis ERA se colectan mediante biopsia endometrial, posteriormente se almacenan en Nitrógeno Líquido a -80 C. El RNA se extrae utilizando el método de TRIzol de acuerdo con el protocolo estándar, (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Waldbronn, Germany). Posteriormente se realiza una Transcripción Reversa (RT-PCR) y el cDNA resultante se amplifica para determinar el estado endometrial y utilizar esta información en un ciclo de transferencia embrionaria posterior. (123)

Aunque la herramienta ERA ha demostrado su utilidad clínica y es utilizada de forma rutinaria en pacientes con falla de implantación, aún no existe una herramienta que describa el perfil de expresión de miRNAs en el epitelio endometrial y permita mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falla en la implantación es un problema clínico frecuente en pacientes sometidas a tratamientos de fertilización *in vitro*. Se trata de un fenómeno complejo que involucra interacciones moleculares entre el embrión en desarrollo y el endometrio receptivo. La comunicación entre ambos es poco conocida y no se han establecido las vías de señalización involucradas. El conocimiento acerca del proceso de implantación en humanos es escaso, por lo que en el presente estudio nos propusimos contestar la siguiente pregunta de investigación.

4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El miR-191-5p embrionario inducirá cambios en el perfil de expresión de miRNAs en las células endometriales?

Para contestar esta pregunta utilizamos la línea celular endometrial RL95-2 la cual fue transfectada con el miR-191-5p embrionario y evaluamos el perfil de expresión de diversos miRNAs.

5.0 JUSTIFICACIÓN

Es importante realizar estudios experimentales con tejidos humanos que ayuden a explicar el fenómeno de la implantación desde el punto de vista molecular, ya que solamente al tener un amplio conocimiento de la fisiología se podrán desarrollar estrategias diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

Aunque existe evidencia de que al menos un miRNA embrionario puede regular la expresión de proteínas endometriales asociadas a implantación, no se ha demostrado si los miRNAs embrionarios modulan la expresión diferencial de miRNAs endometriales involucrados con la ventana de implantación.

Lo novedoso en el presente estudio radica en que no se han descrito moléculas de origen embrionario con la capacidad de incrementar la receptividad endometrial en humanos por lo que realizaremos el análisis de los miRNAs en las células endometriales humanas en un modelo *in vitro*. Lo anterior permitirá obtener

información del intercambio molecular entre ambos componentes del sistema, (endometrio y embrión).

6.0 OBJETIVO E HIPÓTESIS

6.1 Objetivo general

Determinar el perfil de expresión de los miRNAs en las células endometriales estimuladas con el agomiR-191-5p embrionario y establecer blancos moleculares asociados a la ventana implantación.

6.1.1 Objetivos particulares

1. Establecer la expresión diferencial de los miRNAs en las células endometriales RL95-2 transfectadas con el agomiR-191-5p embrionario.
2. Determinar blancos moleculares relacionados con la actividad de los miRNAs de expresión diferencial relacionados con la ventana de implantación.
3. Describir vías moleculares involucradas con la acción de los blancos moleculares en el contexto del proceso de receptividad endometrial.

6.2 Hipótesis.

El miR-191-5p exógeno modificará el perfil de expresión de diversos miRNAs asociados a la ventana de implantación.

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Tipo de estudio: Experimental de comparación de clase.

Tipos de diseño: Experimental biomédico.

a) *Variable dependiente:* Perfil de expresión de miRNA's en la línea celular RL95-2 endometrial.

b) *Variable independiente:* Concentración del agomiR-191-5p embrionario en el tratamiento de células endometriales en cultivo.

7.2 Características y establecimiento de la línea celular RL95-2

La línea celular humana RL95-2 (ATCC, CRL-1671; Manassas, Virginia, USA) proviene de carcinoma de epitelio endometrial de la especie *Homo sapiens*. Su morfología es epitelial, y de crecimiento adherente. Las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio de cultivo DMEM F12 (ATCC 30-2006; Manassas, Virginia, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, Bethesda,

MD, USA) y 1% de antibiótico (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, Gibco, Bethesda, MD, USA). Las células fueron expandidas en caja de cultivo celular de 25 cm² (Corning Tewksbury, MA, USA) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia celular mayor al 80%.

Posteriormente, las células fueron disgregadas con la adición al medio de cultivo de 10% de tripsina (Invitrogen, CA, USA) por 2 minutos y la caja fue incubada a 37°C con 5% de CO₂. Al término de la incubación se recuperó el medio de cultivo y se centrifugó a 1,400 rpm durante 5 minutos y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de medio suplementado y se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer con azul de tripano para diferenciar entre células muertas (que se tiñen de azul) de las células vivas con membranas íntegras (incolores). Una vez realizado el conteo celular se colocaron 80,000 células en placas de 12 pozos (Corning) en 1 mL de medio DMEM F12 suplementado con antibiótico y suero. La transfección de las células RL95-2 endometriales con el agomiR-191-5p se realizó hasta obtener una confluencia celular mayor al 80%.

7.3 Transfección y viabilidad celular.

Las células RL95-2 fueron transfectadas por 6 horas con el agomiR-191-5p a concentraciones de 15, 30, y 60 pmol con las recomendaciones de la casa comercial (Creative Biogene Biotechnology; USA) utilizando 100 nM lipofectamina 2000 (Invitrogen). Posteriormente, en cada intervalo de tiempo se recuperó el medio de cultivo para la obtención del RNA total (*ver sección 7.4*).

Las células fueron lavadas con solución salina y se determinó la viabilidad celular usando azul de tiazolil (Bromuro 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) como fue descrito por Mossman *et al* (125). Las células de cada tratamiento fueron incubadas por 3 horas y posteriormente fueron incubadas con 100 µL de isopropanol ácido (HCl 0.1 N en isopropanol absoluto) y finalmente se determinó la absorbancia a 570 nm. (Fig. 6)

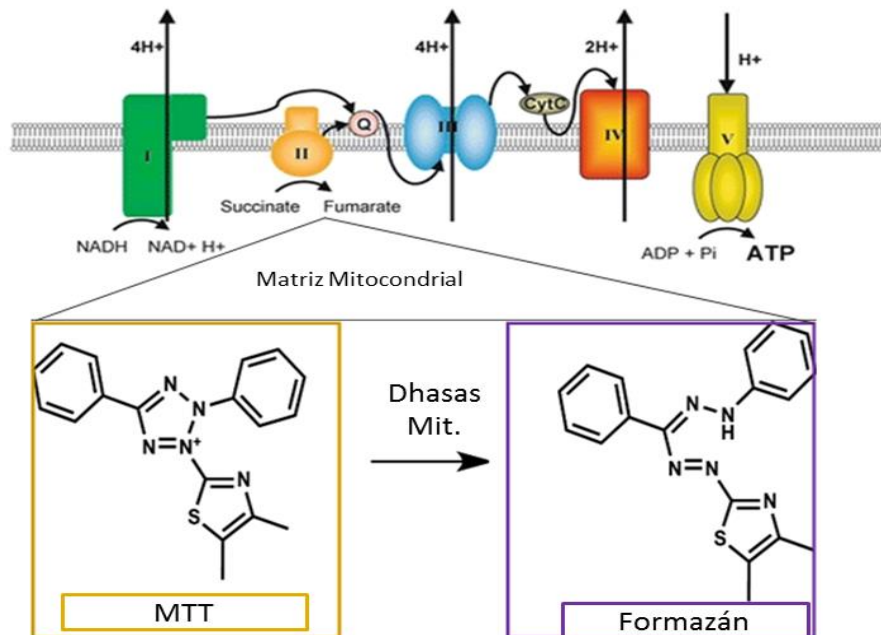


Figura 6. Reducción del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales. Las enzimas deshidrogenasas mitocondriales (Dhasas Mit) del complejo II reducen la sal de tetrazolio (color amarillo) a formazán (color púrpura).

7.4 Obtención del RNA total del medio cultivo celular.

A 500 μ L del medio de cultivo de cada ensayo experimental se les adicionó 500 μ L del reactivo de TRIzol (InvitroGen). (4) El RNA fue resuspendido con 20 μ L de agua inyetable. La concentración del RNA total de cada muestra fue determinada mediante la relación de $A_{260/280}$ y de $A_{260/230}$ en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

La tabla 1 muestra la identificación y la concentración de los medios de cultivo las cuales fueron enviadas a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la Universidad Nacional Autónoma de México con el registro de identificación ID Project_RAcuña_2021 para su secuenciación.

Tabla 1. Identificación de las muestras de RNA del medio de cultivo.

ID MUESTRA	CONDICION	TIEMPO DE ESTIMULACION	A260/280	A260/230	CONCENTRACION (ng/mL)	VOLUMEN
Project_Racuña_01	Control lipofectamina	3 HORAS	1.37	0.15	40	20µL
Project_Racuña_02	transfección con 15nmol agomiR		1.78	0.43	40	20µL
Project_Racuña_03	transfección con 30nmol agomiR		1.48	0.16	40	20µL
Project_Racuña_04	transfección con 60nmol agomiR		1.19	0.19	40	20µL
Project_Racuña_05	Control lipofectamina	6 HORAS	1.16	0.055	40	20µL
Project_Racuña_06	transfección con 15nmol agomiR		0.69	0.065	40	20µL
Project_Racuña_07	transfección con 30nmol agomiR		1.1	0.055	40	20µL
Project_Racuña_08	transfección con 60nmol agomiR		1.16	0.09	40	20µL
Project_Racuña_09	Control lipofectamina	24 HORAS	1.46	0.045	40	20µL
Project_Racuña_10	transfección con 15nmol agomiR		1.36	0.07	40	20µL
Project_Racuña_11	transfección con 30nmol agomiR		1.52	0.07	40	20µL
Project_Racuña_12	transfección con 60nmol agomiR		1.31	0.075	40	20µL

7.5 Secuenciación masiva de los miRNAs y análisis bioinformático.

La expresión masiva diferencial de los miRNAs se realizó mediante la secuenciación de nueva generación (SNG) usando la plataforma de NextSeq550 (Illumina, San Diego, CA, USA) (126, 127) y la cuantificación del RNA-Seq se realizó mediante la plataforma NovaSeq (Illumina) con estrategia de 150 bp, previa transcripción reversa para conversión del RNA en cDNA. Estos adaptadores contienen secuencias complementarias que les permiten unirse a la celda de flujo, de esta forma los fragmentos pueden ser purificados y amplificados.

Después de la secuenciación, el instrumento de software identificó nucleótidos (proceso denominado base calling). Para el análisis de los datos, se importó la secuenciación a una herramienta de análisis estándar DRAGEN v3.5 (Dynamic Read Analysis for GENomics, Illumina). (128)

7.6 Descripción de vías moleculares relacionadas con la receptividad endometrial

Los análisis funcionales se llevarán a cabo utilizando 2 plataformas: 1) IPA (Ingenuity Pathways Analysis, QIAGEN Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>) aporta el análisis que detalla la descripción de vías moleculares y los procesos biológicos relacionados con vías canónicas involucradas con los blancos moleculares (129) y 2) DAVID, un algoritmo que agrupa los genes blanco en categorías funcionales de: procesos biológicos, componentes estructurales, o de funciones moleculares. (130)

8.0 RESULTADOS.

8.1 Establecimiento y viabilidad de la línea celular RL95-2.

La figura 7 muestra la imagen representativa de la línea celular RL95-2 después de cinco días de cultivo. Las células fueron estimuladas por 3, 6, y 24 horas con 100 nM de lipofectamina sola o en combinación con el agomiR-191-5p a tres concentraciones (15, 30, y 60 pmol) y en cada caso se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (fig. 7B) y la expresión del miR-191 (fig. 7C).

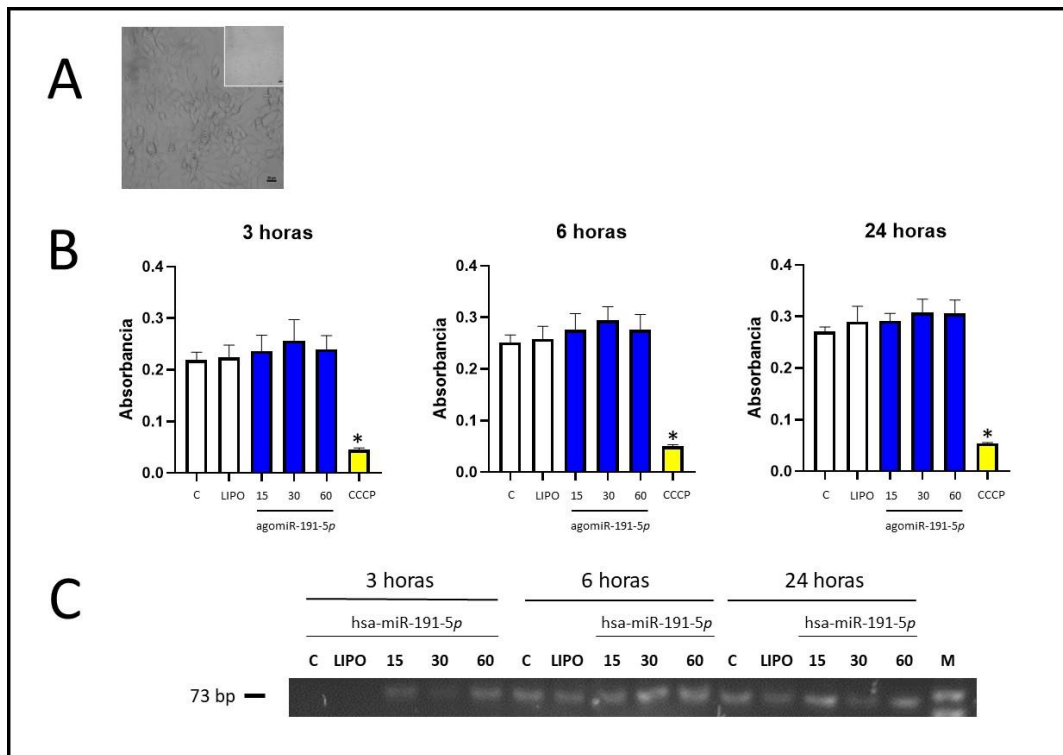


Figura 7 Morfología y viabilidad de las células RL95-2 endometriales de humano. Se aprecia la formación de monocapa celular con forma cuboide y en contacto con otras células. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 10X y 20X. La barra representa la dimensión en micras (μm) **(A)**. Viabilidad de las células RL95-2 en los diferentes tratamientos de transfección **(B)**. grupo control sin tratamiento (C-), adición de lipofectamina 100 nM (LIPO), agomiR- (control), y con la adición de 15, 30, y 60 pmol de agomiR-191-5p. En el ensayo se incorporó el descoplante metabólico carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP; barra en amarillo). La viabilidad se realizó en 3 experimentos independientes y en ninguno de los casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p=0.593$). Los datos se muestran como la media \pm Desviación Estándar. Producto de la amplificación de 73 pb del miR-191-5p obtenido de las células RL95-2. Marcador de DNA de 100 pb (M, InvitroGene).

La figura 7B muestra la viabilidad de las células RL95-2 después de 6 horas de tratamiento. El grupo control (sin tratamiento, C-) tuvieron una absorbancia de 0.219 ± 0.15 la cual aumento con la estimulación de lipofectamina (1.02-veces), agomiR- (1.09-veces), y con 15 (1.14-veces), 30 (1.17-veces), y 60 (1.09-veces) pmol del agomiR-191-5p; sin embargo, no encontramos diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (fig. 7; $p = 0.593$).

Después de que se evaluó la viabilidad de las células RL95-2 transfectadas con el agomiR-191-5p se procedió a obtener el perfil de expresión de los miRNAs del medio de cultivo celular.

8.2 Perfil de expresión diferencial de miRNAs

Mediante la Secuenciación de Nueva Generación obtuvimos un total de 541 hsa-miRNAs humanos los cuales fueron detectadas en el medio de cultivo de las células RL95-2 de las diferentes condiciones experimentales (*ver anexo 1*). Los datos de secuenciación de ARN pequeños se depositaron en el Gene Expression Omnibus (número de acceso GEO; [GSE121406](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE121406)). El análisis reveló 5 miRNAs con expresión diferencial que alcanzaron la diferencia establecida como punto de corte en las células tratadas con el miR-191-5p con respecto a la expresión de con las células control.

8.3 Secuenciación de RNAs pequeños

Para caracterizar los perfiles de expresión de los miRNAs del medio de cultivo de las células endometriales, la secuenciación masiva obtuvo un total de 4,322,087 lecturas limpias. 1,066,170 fueron secuencias específicas de las células control, 1,807,605 fueron específicas de las células tratadas y 391, 038 fueron secuencias de lectura común en todas las muestras.

8.4 Expresión diferencial de miRNAs en células tratadas con agoMIR-191-5p

Se utilizó el programa DESeq2 en lenguaje R, versión 1.26.0 (Int. Max Planck Res School for Computational Biol Res, NIH) el cual es de acceso libre <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html> se identificaron mediante análisis binomial negativo los miRNAs que exhiben patrones de expresión significativamente diferentes entre las líneas celulares RL95-2 control y las tratadas obteniendo un total de 541 miRNAs, la mayoría de los cuales no guardaron una relación lineal con la dosis ni el tiempo de exposición al tratamiento.

Del resultado de expresión de masiva de miRNAs se realizaron un total de 45 comparaciones pareadas entre el grupo control vs los tratamientos experimentales y solo se tomaron como significativos cuando la regulación mostro una tasa de cambio ≥ 2 veces de incremento o disminución en la expresión con relación directamente proporcional a la dosis y tiempo de exposición al agoMIR-191-5p.

La figura 8 representa el cambio de expresión con respecto a la concentración del agomir y el tiempo de estimulación. El 89.4% de los miRNAs secuenciados mostraron inconsistencias con respecto a la concentración del agomir y al tiempo de estimulación. El 9.6% aunque mostraron una diferencia significativa no tuvieron una tasa de cambio ≥ 2 con respecto al grupo control y solamente el 1% mostró una tasa de cambio ≥ 2 con respecto al grupo control.

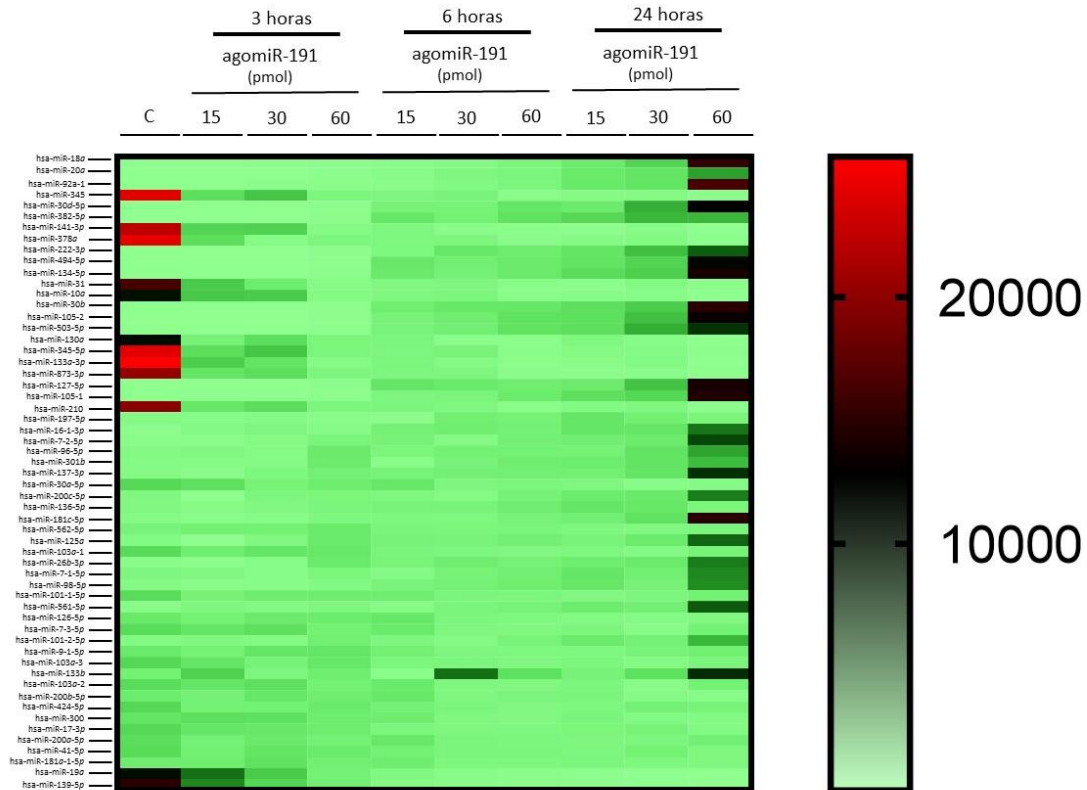


Figura 8. Modulación de miRNAs en las células RL95-2 estimuladas con el agomiR-191. Se muestra la regulación diferencial de 57 miRNAs con respecto al grupo control (C). Se muestra el incremento de expresión de 3 miRNAs con \log_2 FC \geq 2 y con valor a $p < 0.05$ con efecto de la dosis y el tiempo de exposición al agomiR 191-5p.

La tabla 2 muestra la tasa de cambio en la expresión de 57 miRNAs correspondientes a la figura 8 detectados en el medio de cultivo de las células RL95-2. Sobre la base de la definición de comparación de conglomerados utilizada en el presente estudio, se observó que 3 miRNAs aumentaron, hsa-mir-18a, hsa-mir-20a, y hsa-miR-92-5p, y 2 miRNAs disminuyeron, hsa-mir-19a y hsa-mir-139-5p, significativamente el nivel de expresión con respecto al grupo control.

Tabla 2. Tasa de cambio de miRNAs representativos detectados en el medio de cultivo de las células endometriales RL95-2 estimulados con el agomiR-191-5p.

miRNAs	Mirbase número de acceso	tasa de cambio (control/tratamiento)	valor de P
hsa-miR-18 ^a	MI0000093	2.31633572	0.001856681 *
hsa-miR-20 ^a	MI0000076	2.166698266	0.00232568 *
hsa-miR-92a-1	MI0000072	2.133691423	0.00340542 *
hsa-miR-30d-5p	MI0000255	1.996629871	0.059089723 §
hsa-miR-382-5p	MI0000790	1.993613246	0.005592734 §
hsa-miR-378a	MI0000786	1.991819909	0.009359307 §
hsa-miR-222-3p	MI0000299	1.991044996	0.009226886 §
hsa-miR-494-5p	MI0003134	1.987655311	0.007436781 §
hsa-miR-134-5p	MI0000474	1.987654113	0.008263455 §
hsa-miR-30b	MI0000441	1.984167796	0.004729916 §
hsa-miR-105-2	MI0000112	1.984012422	0.008367616 §
hsa-miR-503-5p	MI0003138	1.978787651	0.006342567 §
hsa-miR-127-5p	MI0000472	1.973698634	0.007497681 §
hsa-miR-105-1	MI0000111	1.973545431	0.001788191 §
hsa-miR-197-5p	MI0000239	1.96930252	0.275742594
hsa-miR-16-1-3p	MI0000070	1.952562173	0.80687517
hsa-miR-7-2-5p	MI0000264	1.901928013	0.073663983
hsa-miR-96-5p	MI0000098	1.881772745	0.298488409
hsa-miR-301b	MI0000089	1.840421208	0.214001194
hsa-miR-137-3p	MI0000454	1.831548105	0.309677748
hsa-miR-30a-5p	MI0005525	1.806871809	0.688771332
hsa-miR-200c-5p	MI0000650	1.776267359	0.814803673
hsa-miR-136-5p	MI0000475	1.774360942	0.420846348
hsa-miR-181c-5p	MI0000271	1.747939155	0.253723213
hsa-miR-125a	MI0000469	1.685412353	0.688771332
hsa-miR-103a-1	MI0000108	1.654235859	0.765217998
hsa-miR-26b-3p	MI0000084	1.650288678	0.442229945
hsa-miR-7-1-5p	MI0000263	1.533734563	0.479590272
hsa-miR-98-5p	MI0000100	1.51682521	0.035493992
hsa-miR-101-1-5p	MI0000103	1.504044719	0.765217998
hsa-miR-561-5p	MI0003567	-1.52978705	0.576223797
hsa-miR-126-5p	MI0000471	-1.572163541	0.59570534
hsa-miR-7-3-5p	MI0000265	-1.604060194	0.600160938
hsa-miR-101-2-5p	MI0000739	-1.611473998	0.411010577
hsa-miR-9-1-5p	MI0000466	-1.62652475	0.435811656

El valor de corte utilizado como tasa de cambio en la expresión de los miRNAs fue >2.0 y estadísticamente significativo de * $p < 0.05$ con respecto al grupo control. Se indican aquellos miRNAs cercanos al valor de corte cercano a 2 y estadísticamente significativos § $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

Continua tabla 2

miRNAs	Mirbase número de acceso	tasa de cambio (control/tratamiento)	valor de P
hsa-miR-103a-3	MI0000108	-1.654235859	0.665463537
hsa-miR-133b	MI0000822	-1.691861824	0.499857766
hsa-miR-103a-2	MI0000108	-1.728486111	0.63923549
hsa-miR-200b-5p	MI0000342	-1.729126512	0.143228653
hsa-miR-562-5p	MI0003567	-1.737369812	0.965341479
hsa-miR-424-5p	MI0001446	-1.772549085	0.513662247
hsa-miR-300	MI0005525	-1.806871809	0.362566534
hsa-miR-17-3p	MI0000071	-1.830414525	0.535301903
hsa-miR-200a-5p	MI0000737	-1.887272938	0.960904701
hsa-miR-41-5p	MI00002464	-1.918844268	0.927660047
hsa-miR-210	MI0000286	-1.973231611	0.040325367 §
hsa-miR-873-3p	MI0005564	-1.974140489	0.006918301
hsa-miR-133a-3p	MI0000450	-1.974937956	0.00543327 §
hsa-miR-345-5p	MI0000825	-1.976693672	0.021284542 §
hsa-miR-130a	MI0000448	-1.976984848	0.002685956 §
hsa-miR-10a	MI0033895	-1.984613132	0.098671705
hsa-miR-31	MI0000089	-1.986728612	0.049170094 §
hsa-miR-181a-1-5p	MI0000289	-1.992405895	0.062937608
hsa-miR-141-3p	MI0000457	-1.992589523	0.003386874 §
hsa-miR-345	MI0000825	-1.999492541	0.001668754 §
hsa-miR-19a	MI0000073	-2.141977849	0.002812841 *
hsa-miR-139-5p	MI0000261	-2.248816502	0.002186777 *

El valor de corte utilizado como tasa de cambio en la expresión de los miRNAs fue >2.0 y estadísticamente significativo de * $p < 0.05$ con respecto al grupo control. Se indican aquellos miRNAs cercanos al valor de corte cercano a 2 y estadísticamente significativos § $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

En la línea celular tratada, has-mir-18a, has-mir-20a, y hsa-miR-92-5p se incrementó su expresión con respecto a las dosis y al tiempo de estimulación mientras que has-mir-19a y has-mir-139-5p disminuyeron su expresión de manera dosis dependiente (fig. 9, y tabla 2)

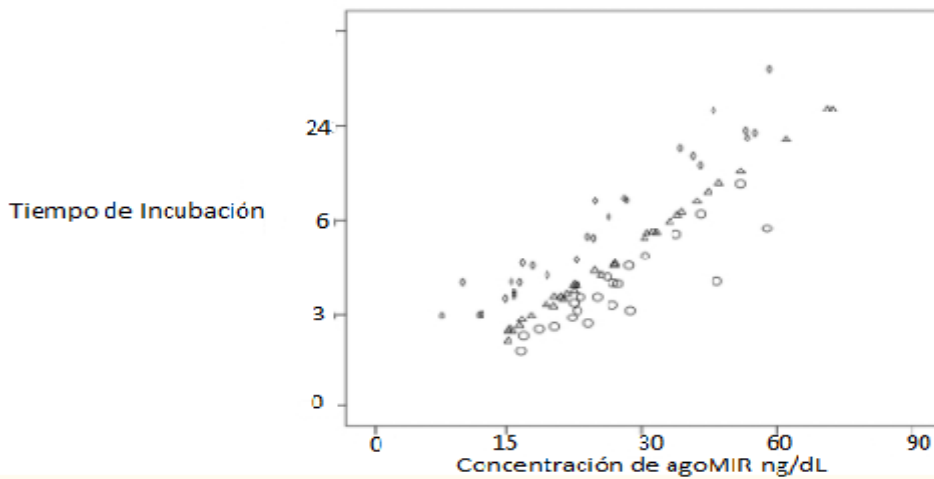


Figura 9. Efecto de dosis y tiempo. Se muestra en escala logarítmica (\log_2 FC) el incremento en la expresión de los 3 miRNAs como un efecto de la dosis y el tiempo de exposición al agoMIR 191-5p. Círculos: miR-20a, triángulos miR-18a, diamantes miR-139-5p. El tiempo de exposición se expresa en horas.

8.5 Blancos moleculares de los miRNAs que modificaron su expresión

La relación entre las variaciones en la expresión de los miRNAs fue predicha mediante el análisis del software TargetScanHuman v8.0 targetscan.org/vert_80/ (Bioinf Res Com., Whitehead Inst Bio Res, Cambridge, MA, USA). Un total de 25 interacciones entre los miRNAs y sus mRNAs blancos fueron encontradas (fig. 9). El aumento de 3 miRNAs (hsa-miR-18a, hsa-miR20a-5p, y hsa-miR-92a-5p) están asociados con la disminución de 15 mRNA blancos y la disminución de dos miRNAs (hsa-miR 19a-5p, y hsa-miR-139a-5p) estaría asociado con el incremento de 10 mRNA blancos, (se seleccionaron los 5 blancos con mayor afinidad termodinámica)

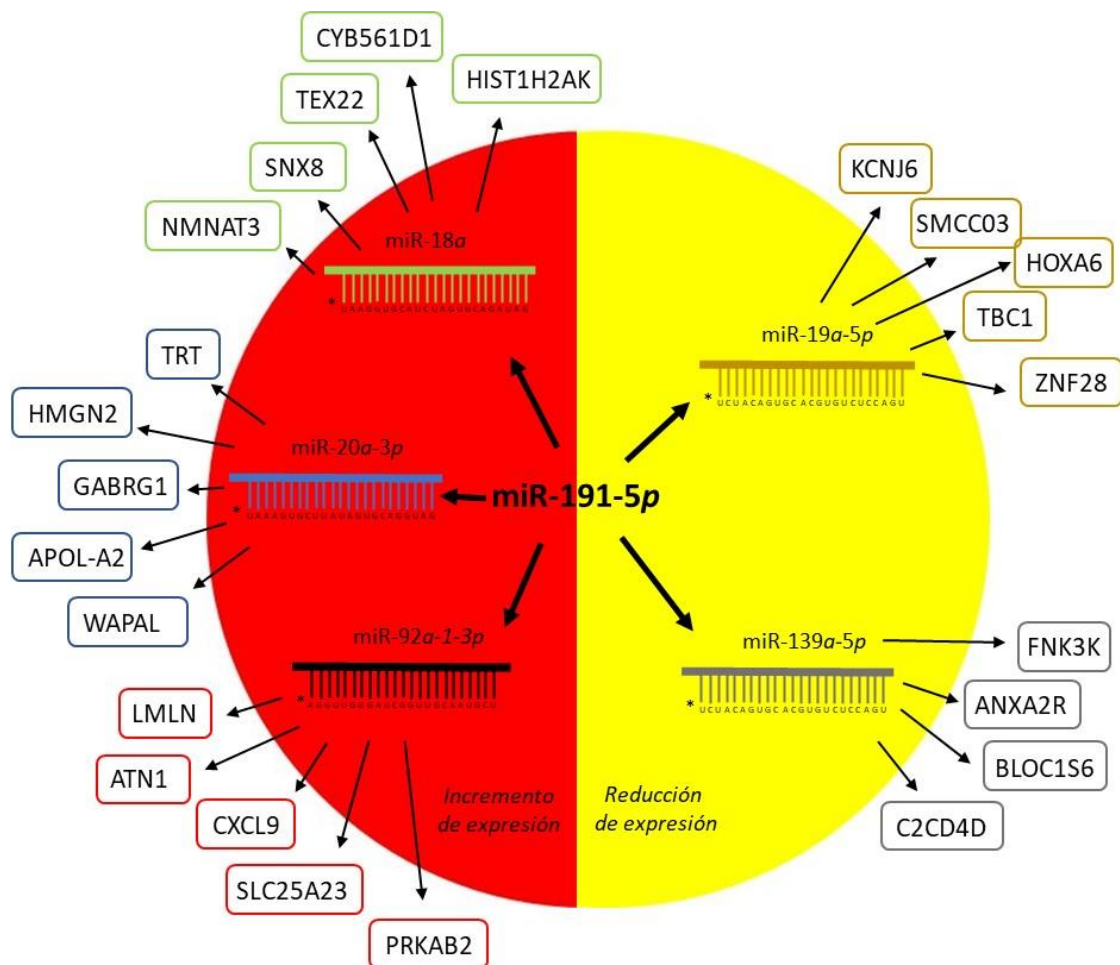


Figura 10. Regulación de mRNA mediada por miRNA's.

Se establecieron un total de 25 interacciones de las cuales 15 reduce la expresión del mRNA por acción del aumento de 3 miRNAs (rojo) y 10 aumentan la expresión del mRNA por acción de la disminución de 2 miRNAs (amarillo).

miR-18a

Se describen 5223 transcripciones con sitios de unión a miR-18a que contienen un total de 7978 sitios de empalme con sitios UTR, la mayoría de los cuales son falsos positivos. La figura 11 muestra cinco blancos de mRNA ordenadas por contexto ponderado acumulativo que mostraron la mayor afinidad termodinámica de unión.

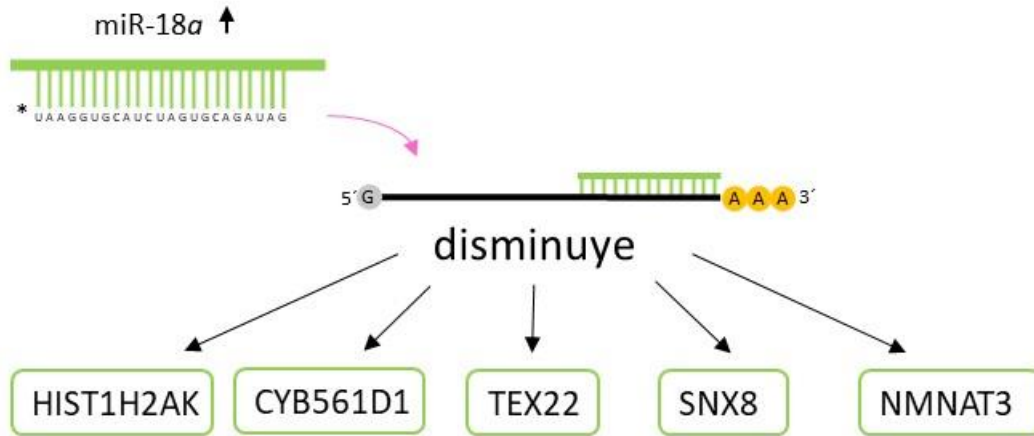


Figura 11. HIST1H2AK, *histonas de tipo 1*, y *H2ak*; CYB561D1, *familia del citocromo b561, miembro D1*; TEX22, *testículo expresado 22*; SNX8, *clasificación de nexina 8*; NMNAT3, *nicotidaminanucleótido adeniltransferasa 3*.
* La secuencia se obtuvo de la base miRBase.

La expresión del hsa-miR-18a estaría reduciendo la concentración de 5 mRNA blancos, por lo que su traducción se encontraría significativamente disminuida en las células endometriales que se exponen a un embrión competente.

miR-20a-3p

Se obtuvieron 4375 transcripciones con sitios de unión al miR-20a-5p que contienen un total de 5953 sitios de empalme con sitios UTR, la mayoría de los cuales son falsos positivos. La figura 12 muestra cinco blancos de mRNA ordenadas por contexto ponderado acumulativo que mostraron la mayor afinidad termodinámica de unión.

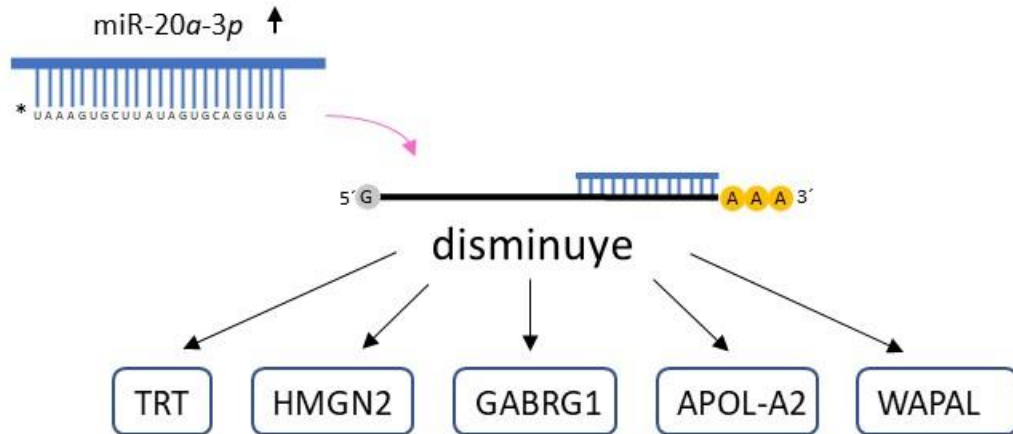


Figura 12. TRT, *transtirhetina*; HMGN2, *high mobility group nucleosomal binding domain2*; GABRG1 *gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1*; APOL2 *apolipoprotein L, 2*; WAPAL *wings apart-like homolog*.
 * La secuencia se obtuvo de la base miRBase.

La expresión del hsa-miR-20a-5p reducirá la concentración de estas 5 mRNA blancos por lo que sus proteínas se encontrarán significativamente disminuidas en las células endometriales que se exponen a un embrión competente.

miR-92a-1-3p

Se describen 3264 sitios de transcripción con sitios de unión al miR-92a-5p que contienen un total de 4069 sitios de empalme con sitios UTR, la mayoría de los cuales son falsos positivos. La figura 13 muestra cinco blancos de mRNA ordenadas por contexto ponderado acumulativo que mostraron la mayor afinidad termodinámica de unión.

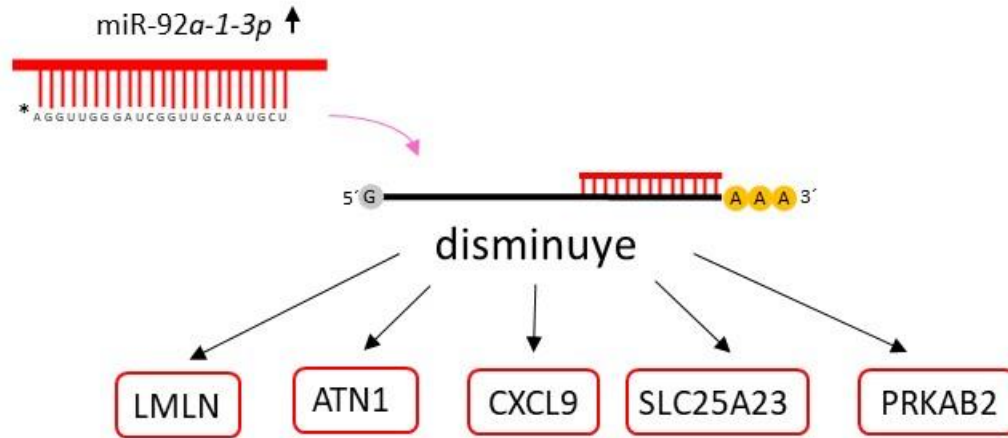


Figura 13. LMLN, *metalopectidasa 8*; ATN1, *atrofina 1*; CXCL9, *ligando 9 de quimiocinas con motivo C-X-C*; SLC25A23 *acarreador mitocondrial de fosfato miembro23*; PRKAB2, *Icinasa de proteína activada por AMP subunidad beta 2 no-catalítica*. * La secuencia se obtuvo de la base miRBase.

La expresión del hsa-miR-92a-5p reducirá la concentración de estas 5 mRNAs blancas por lo que sus proteínas se encontrarán significativamente disminuidas en las células endometriales que se exponen a un embrión competente.

Blancos moleculares de los miRNAs con disminución en la expresión

miR-19a-5p

Se describen 4894 transcripciones con sitios de unión a miR-19a-5p que contienen un total de 7236 sitios de empalme con sitios UTR, la mayoría de los cuales son falsos positivos. La figura 14 muestra cinco mRNAs que presentaron la mayor afinidad termodinámica de unión.

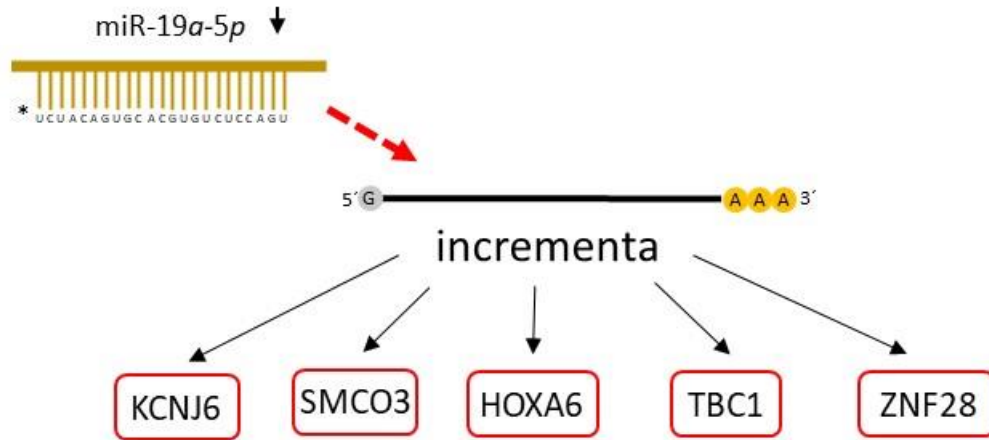


Figura 14. KCNJ6, canal rectificante interno de potasio subfamilia J miembro6; SMCO3, proteína de membrana de paso único; HOXA6, homeobox A6; TBC1, familia de dominios TBC1 miembro 19; ZNF28, proteína de dedo de zinc28. * La secuencia se obtuvo de la base miRBase.

La disminución encontrada del hsa-miR-19a-5p se espera que la concentración de 5 mRNAs se encuentre significativamente incrementada en las células endometriales que se exponen a un embrión competente.

miR-139a-5p

Se describen 3128 transcripciones con sitios de unión a este miRNA, que contienen un total de 3767 sitios de empalme con sitios UTR, la mayoría de los cuales son falsos positivos. La figura 15 muestra cinco mRNAs que presentaron la mayor afinidad termodinámica de unión.

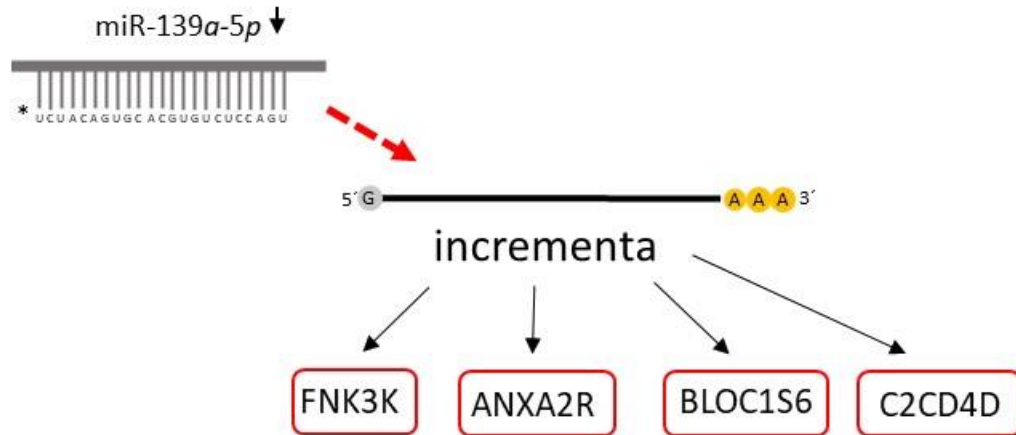


Figura 15. HOXA6, *homeobox A6*; FNK3K, *fructosamina 3 quinasa*; ANXA2R, *receptor de anexina A2*; BLOC1S6, *biogénesis del complejo de orgánulos lisosomales*, C2CD4D, *dominio dependiente de calcio C2 que contiene 4D*. * La secuencia se obtuvo de la base miRBase.

Al disminuir hsa-miR-139a-5p se espera que la concentración de estas 5 proteínas se encuentre significativamente incrementada en las células endometriales que se exponen a un embrión competente.

8.6 Vías Biológicas asociadas a los miRNAs de expresión diferencial.

De los 5 miRNAs con expresión diferencial, 4 pertenecen a la familia miR17-92: miR18-a, miR19a-5p, miR-20a-3p, y miR-92a-5p, correspondiente a un clúster de transcripción policistrónica en el cromosoma 13, que se encuentra en el contexto genómico: Coordenadas (GRCh38; [GCA_000001405.15](#)) chr13: 91351314-91351391 [+], descrito en mirBASE. Dicho clúster se denomina miR-17-92. La familia miR-17 ~ 92 de miRNA está compuesta por tres genes de miRNA policistrónicos relacionados, altamente conservados, que codifican colectivamente para un total de quince miRNAs. Estudios recientes que demuestran que estos miRNAs son esenciales para el desarrollo de vertebrados y la homeostasis.

Estudios previos han demostrado que los genes miRNA están dispuestos como grupos en el cromosoma. Los miembros de un grupo de miRNA suelen compartir similitudes de secuencia y coordinan la regulación de procesos biológicos similares.

Cuando los miembros de un grupo de genes exhiben similitud de secuencia y regulación homóloga, forman familias de genes miRNA, que aumentan aún más la diversidad de la distribución del grupo de genes miRNA. Los estudios anteriores se han centrado generalmente en la expresión y regulación de miRNAs individuales, mientras que los estudios que investigan la expresión y función de los miRNAs agrupados son poco frecuentes y los estudios que examinan el perfil de expresión de los clusters de miRNA a nivel de todo el genoma son particularmente limitados. Sin embargo, los patrones de expresión de los miRNAs homólogos dispuestos como clusters suelen estar coordinados.

Los grupos o clústers de miRNAs poseen una red reguladora compleja, asociada con la expresión, en comparación con la regulación de los miRNAs individuales. Los miembros miRNA de ciertos grupos de genes están funcionalmente asociados y pueden dirigirse o regular genes idénticos o la misma familia de genes, o dirigirse a varios componentes proteicos de la misma vía de señalización. Las secuencias de los miembros en el grupo de genes miR-17-92 están altamente conservadas en todos los vertebrados, y el grupo de genes miR-17-92 ha recibido una amplia atención, ya que se ha sugerido que está involucrado en el desarrollo de órganos de mamíferos, que es una función que se cree que está estrechamente asociada con el inicio del desarrollo de tumores sólidos. Los miembros del grupo de genes miR-17-92 se expresan en niveles altos en numerosas células tumorales, incluidas las del linfoma de células B, así como el cáncer de pulmón, hígado, vejiga, colon, estómago y páncreas. Además, se cree que los miembros del grupo de genes miR-17-92 inducen tumorigénesis principalmente al inhibir la expresión de genes que regulan los oncogenes y el ciclo celular.

El patrón único de distribución y expresión de los grupos de genes miRNA ha sugerido que pueden poseer importantes funciones reguladoras. Como numerosos miRNAs se distribuyen en grupos, la mayoría de estos grupos de genes se transcriben simultáneamente y co-regulan una serie de procesos biológicos. Por lo tanto, la investigación de grupos de genes miRNA, en lugar del estudio de la expresión de miRNAs individuales, puede presentar una nueva estrategia de

investigación. Como la tecnología de secuenciación de alto rendimiento se ha utilizado ampliamente en la investigación de miRNA, es posible que los estudios sobre la expresión y la función de los grupos de genes mejoren aún más la investigación referente a los miRNAs.

En el presente estudio, se reveló que el grupo has-miR-17-92 exhibió un patrón de expresión inconsistente, ya que 3 miembros de la familia incrementaron su expresión de forma proporcional al tratamiento, pero uno de ellos, miR-19a, se reguló a la baja en presencia de dosis crecientes y mayor tiempo de exposición al miR-191-5p, en la línea celular RL-95-2. Esto sugiere que dicho tratamiento desencadena un aumento global de la transcripción policistrónica de la región intragénica donde se ubica la familia miR17-92 en el cromosoma 13, pero existe algún mecanismo poco conocido que de manera selectiva disminuye la expresión de un único miembro de la familia en respuesta al miR-1915p, señalando que los blancos moleculares de miR-19a-5p (KCNJ6, SMCO3, HOXA6, TBC, ZNF28) incrementan su expresión en el tejido endometrial en presencia de embriones competentes.

El único miRNA no relacionado con la familia 17-92 que demostró una disminución continua en su expresión con mayores dosis de agomir-191-5p, fue hsa-mir-139-5p. Este miRNA se ha relacionado con distintos tipos de tumores, en particular con cáncer endometrial. Se ha demostrado previamente que el miR139-5p disminuye su expresión en cáncer de endometrio humano, comparado con células no neoplásicas. La sobreexpresión de miRNA-139-5p inhibe significativamente la viabilidad celular y la migración de las células neoplásicas. Se ha identificado a HOXA6 como el principal blanco molecular de este miRNA, por lo que se espera que la traducción de dicha proteína incremente significativamente en células endometriales expuestas al agoMIR-191-5p procedente de un embrión competente. HOXA6 es un miembro de la familia de genes HOX (Homeotic Box) que regulan la morfogénesis embrionaria, además de ser esencial en la formación de pinópodos en el epitelio endometrial al momento de la ventana de implantación. Hoxa10 también se expresa abundantemente en pacientes con endometriosis. Su expresión aberrante fue

observada por primera vez en casos de leucemia. Tanto la disminución como el aumento en la expresión de HOXA6 han sido relacionados con procesos implicados en el cáncer, incluyendo la proliferación, apoptosis, transición epitelio-mesenquimatoso (que es también un evento fundamental del desarrollo embrionario temprano) y resistencia a la quimioterapia.

Estos hallazgos no solo proporcionan nuevos biomarcadores potenciales para diferenciar entre el endometrio receptivo y no receptivo, sino que también revelan algunas de las vías moleculares reguladas por miRNAs asociadas con los mecanismos subyacentes al desarrollo embrionario temprano.

Tras una revisión de la literatura previa sobre la ventana de implantación y la expresión de miRNA, también se identificó que la expresión de la familia miR-200 aumentó significativamente durante el periodo de receptividad del endometrio. Se observó que los niveles de expresión de has-miR-200a, has-miR-429 y has-miR-141 en la familia miR-200 aumentaron significativamente en la línea celular RL-95-2, en comparación con la línea celular tratada. Este hallazgo también se verificó mediante secuenciación.

Los presentes hallazgos preliminares orientan hacia un estudio in vivo en el que se pueda administrar miR-191-5p directamente en el endometrio de mujeres con ciclos regulares para determinar su efecto durante la fase progestacional, en particular durante la ventana de implantación.

9.0 DISCUSIÓN.

La receptividad endometrial desempeña un papel fundamental en la determinación de la implantación exitosa del blastocisto en los ciclos de Fertilización *in vitro*. (131) Variaciones en la expresión génica en pacientes infértiles ha sido asociada con fallas en la sincronización en la ventana de receptividad produciendo deficiencias en la implantación. (132)

Los resultados en el presente estudio sugieren que al transfectar a las células endometriales RL95 con el miR-191-5p embrionario el cual ha sido relacionado con la tasa de implantación (4) se incrementa significativamente la expresión del miR-18a, miR-20a-5p, miR-92a-5p y se disminuyen la expresión del miR-19a-5p y miR-139a-5p (Fig. 10) lo cual fue demostrado mediante secuenciación profunda de nueva generación (NGS).

Estos miRNAs modulan proteínas relacionadas con la decidualización a través de las vías de señalización asociadas a marcadores de implantación como el LIF (Leukemia inhibitor factor), (107) PRL (prolactina) (133), y el IGFBP-1 (Insulin Growth Factor Binding Protein-1), (134) y a nivel epigenético estos miRNAs están involucrados con la metilación del DNA (135) y con la actividad de RNAs largos no codificantes (lncRNA) (136) los cuales han sido analizados y vinculados con la ventana de implantación. Recientemente, Ching et al (2021) demostraron en 25 pacientes con repetidas fallas de implantación la expresión de miRNAs regula la expresión de los miR-20b-5p, miR-155-5p, y miR-718 lo cual fue demostrado mediante tecnología de microarreglos. (137)

De los 5 miRNAs de expresión diferencial detectados mediante la secuenciación de NGS 4 pertenecen al clúster 17-92 (miR-18a, miR-19a-5p, miR-20a-5p y miR-92a-5p). Dicho clúster se encuentra altamente conservado en los vertebrados y se ha demostrado que su versión truncada (carente de miR-92) produce un linfoma de células B (onco-miR), (138) y con procesos patológicos del tejido endometrial como la endometriosis, (139) la hiperplasia endometrial atípica y el adenocarcinoma endometrial. (140) Actualmente, no existen estudios que evalúen la relación del

clúster 17-92 con la receptividad endometrial en humanos, aunque se ha descrito la participación de alguno de sus miembros en los primeros días de la gestación en roedores. (32)

MiRNAs con incremento de expresión: miR-18a, miR-92a-1, miR-20a

Blancos moleculares y su función biológica: mir-18a

Mediante análisis *in Silico* se determinó que los principales blancos moleculares del miR-18a están involucrados en la actividad de oxidorreducción y con el transporte intracelular (Figura 10).

TEX22 (Testis Expressed 22), miembro de una familia que desempeña un papel fundamental en la reproducción humana, particularmente en la gametogénesis. Se ha descrito su expresión en testículo y ovario, aunque se desconoce su función en el endometrio humano. Se sabe que su deficiencia está involucrada directamente en infertilidad de origen masculino. (141)

CYB561D1 (Cytochrome b561 family member D1), cuya función molecular corresponde a una proteína reductasa transmembranal que utiliza ascorbato como donador de electrones, a través de la membrana para reducir cationes de hierro, y radicales mono-dehidro L-ascorbato en otro compartimento celular. Además, posee actividad de unión al grupo hemo y actividad oxido-reductasa. Durante la ventana de implantación se presenta un incremento significativo del potencial oxidorreductor en el epitelio endometrial. Al disminuir las concentraciones de CYB561D1 se podría explicar el incremento del potencial oxidorreductor durante la ventana de implantación. (142) Se ha descrito que los radicales libres de oxígeno incrementan el estrés oxidativo y en altas concentraciones son deletéreos para la implantación, pero en bajas concentraciones son valiosas moléculas de señalización para los procesos de invasividad del trofoectodermo hemocorial del ser humano. (143)

SNX8 (Sortin Nexin 8) es otra proteína regulada a la baja por miR-18a, esta proteína presenta actividad de unión a proteínas y unión a fosfatidilinositol. Está involucrado en el transporte temprano de proteínas del endosoma, y se localiza en el complejo

retrómero y en el complejo trans-Golgi. Funciona regulando el tráfico intracelular de moléculas y vesículas, potencialmente también de exosomas para la secreción y almacenamiento de miRNAs al medio extracelular. La disminución de SNX-8 mediada por miR18a podría inhibir el transporte de moléculas endosómicas hacia el sistema trans-Golgi, lo cual inhibiría el transporte intracelular de moléculas favoreciendo la exportación de vesículas hacia el medio extracelular. (144) Esta vía ha sido poco estudiada en el tejido endometrial.

HIST1H2AK es otra proteína regulada a la baja por miR-18a. Las histonas son proteínas nucleares responsables de la estructura de las fibras cromosómicas. En eucariotas, dos moléculas de cada una de las histonas “core” (H2A, H2B, H3 y H4) forman un octámero, alrededor del cual se enredan aproximadamente 146 bp de DNA en unidades repetitivas denominadas nucleosomas. La histona ligadora H1 interactúa con el DNA ligador entre nucleosomas y funciona en la compactación de la cromatina dentro de estructuras de alto orden. Este gen carece de intrones y codifica una histona dependiente de la replicación, que es un miembro de la familia de histonas H2A. Los transcritos carecen del extremo poli-A, pero contienen un elemento de terminación palindrómico. Se encuentra en 6p22—p 21.3.

El control epigenético de la receptividad endometrial y la decidualización fundamentalmente apunta a la expresión de genes marcadores, y la combinación de estudios *in vivo* e *in vitro*. Se ha descrito el papel de las histonas en el mantenimiento de la quiescencia uterina en el embarazo temprano, además de que la metilación de histonas está relacionada con la diferenciación endometrial a través del ciclo menstrual, la disminución de histonas promueve la expresión de genes esenciales en la decidualización como WNT4, ZBTB16, PR0K1 y GREB1. (145)

NMNAT3 (Nicotinamide nucleotide adenililtransferase) es una enzima que utiliza ATP para catalizar la síntesis de nicotinamida o ácido nicotínico mononucleótido. La proteína codificada se localiza en la mitocondria y podría también tener un papel neuroprotector como chaperona molecular. Presenta una amplia expresión en el ovario y testículo. La disminución en la expresión de esta enzima en el endometrio

estaría relacionada con la depleción de NAD, y consecuente incremento del estrés oxidativo al suprimir las reacciones redox dependientes de NAD. (146).

Blancos moleculares y su función biológica: mir-20a-3p

Se evaluaron las 5 proteínas cuyo mRNA presenta la mayor afinidad termodinámica por miR-20a-3p: HMG2, (High Mobility Group nucleosomal binding domain) APOL2, (Apolipoprotein-like homolog) WAPAL (Wings-apart-like homolog), GABRG1 (Gamma aminobutyric acid receptor GAMMA-1), CCL4 (Chemokine C-C motif) ligand 4.

Al incrementar la expresión del miR-20a, disminuye CCL4, Chemokine (C-C Motif) ligand 4, también conocida como proteína 1-beta (MIP-1 Beta) una proteína que bloquea la quimiotaxis (migración) de las uNK (Uterine Natural Killer). También posee Actividad citocina, se localiza en la región extracelular, regula procesos biológicos de quimiotaxis de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como la respuesta celular al factor de necrosis tumoral, se asocia a vías acopladas a proteínas G, y regula la adhesión celular.

Su disminución inhibe la migración de células NK uterinas (uNK: uterine Natural Killer cells). Michael J. Robertson, Role of chemokines in the biology of natural Killer cells) La disminución de esta variante en el endometrio se relaciona con un incremento en los mediadores de inflamación y disminución en la angiogénesis. Las células NK son los leucocitos más abundantes durante la gestación y son reclutados y activados mediante hormonas ováricas. Existen dos subpoblaciones de células NK: las CD 56 (dim) C16+, que migran en respuesta a CXL y CXCL1; y las NKCD56 (bright) CD16-, las cuales migran en respuesta a CCR5 y CCR7. En el primer trimestre, las células NK representan el 70% de los linfocitos deciduales. En el embarazo normal, las NK generan un microambiente que es compatible con la gestación y promueven la placentación saludable, existe una cooperación entre NK's y trofoblasto en lo que se conoce como eje inmuno-trofoblasto, que regula la

placentación, la respuesta inmunológica y la remodelación del aporte vascular (angiogénesis).

APOL-A2 (Apolipoprotein-like homolog) es un miembro de la familia de genes de la apolipoproteína L, son proteínas de unión a lípidos, cuya función molecular es la unión a receptor de señalización, unión a lípidos y unión a partículas de lipoproteínas de alta densidad. Se ubica en el componente celular del citoplasma, la membrana del retículo endoplásmico y la membrana celular. Se involucra en los siguientes procesos biológicos: desarrollo de organismos multicelulares, procesos metabólicos de lipoproteínas, procesos metabólicos del colesterol, respuesta de fase aguda. Apol-2 interactúa con IFN-gamma, CD81, TNF-alfa y Bcl-2, regulando la respuesta inflamatoria sistémica, procesos metabólicos de lípidos (colesterol). Posee un potencial anti-implantación, postulamos que la elevación del miR-20a, al disminuir sus concentraciones, se relaciona con un incremento en las características receptivas del tejido endometrial, de igual forma se ha descrito que la gonadotrofina coriónica humana secretada por el trofoblasto humano inhibe potentemente la expresión de APO-A1 (147)

WAPAL (Wings-apart-like homolog) regula procesos tales como la inhibición de la replicación del DNA, regulación negativa de la actividad de unión a la cromatina, regula la cohesión de las cromátides hermanas, todo lo anterior inhibe la asociación de las cohesinas con las cromátides. La localización celular de WAPAL es en el aparato de Golgi, puentes intercelulares, y el citoesqueleto del microtúbulo. Las patologías asociadas con la deficiencia de esta proteína son el Síndrome de Cornelia De Lange, y el Síndrome focomélico de Roberts. La cohesión de las cromátides asegura que los cromosomas se dividan de manera precisa tanto en mitosis como en meiosis.

HMGN2 (High Mobility Group Nucleosome Binding Domain) es una proteína cromosómica no histona de unión al ADN, y está asociada con la cromatina transcripcionalmente activada. Mantiene una configuración de cromatina abierta,

también tiene actividad antimicrobiana. Hasta el momento no tenemos conocimiento de su papel en el desarrollo de la receptividad del epitelio endometrial humano.

GABRG1 (Gamma aminobutyric acid receptor GAMMA-1). El receptor tipo A del Ácido Gamma Aminobutírico (GABA) (Subunidad Gamma-1, de una proteína pentamérica) es otra proteína regulada a la baja por miR-20a, la proteína codificante pertenece a la familia de canales iónicos, es una proteína integral de membrana y juega un papel importante inhibiendo la neurotransmisión uniéndose al receptor benzodiazepina y abriendo un canal de cloro integrado a la membrana, las vías biológicas relacionadas son la señalización por AKT y la vía de NF-Kappa-Beta, se desconoce una función específica de esta proteína en el endometrio humano.

Blancos moleculares y función biológica: mir-92a-1-3p

CXCL-9 (Chemokine C-X-C motif, ligand 9) esta quimiocina es miembro de la familia conocida como monokina inducida por interferón (MIG), que promueven la quimiotaxis y diferenciación celular, y multiplicación de leucocitos, ocasiona su extravasación tisular. Estas funciones se verían comprometidas al disminuir sus concentraciones en respuesta al incremento de miR-92a-1; probablemente esto favorece la acción de otras quimiocinas atractoras de células u-NK, acción relacionada con la actividad ejercida por miR-20a en cuanto a la regulación de CCL4, estas acciones sinérgicas de 2 miRNAs del clúster 17-92 podrían potenciar la capacidad receptiva del epitelio endometrial en respuesta al miR-191-5p embrionario.

SLC25A23 (solute carrier family 25 member 23) es un acarreador mitocondrial la cual transporta aminoácidos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, cofactores, iones inorgánicos, y nucleótidos a través de la membrana mitocondrial interna, evitando la pérdida significativa de protones. Dichas moléculas son el sustrato para diversos procesos celulares como la fosforilación oxidativa de azúcares y grasas, catabolismo de aminoácidos, producción de calor y la síntesis del grupo hemo. SLC25 es una familia de proteínas con 53 miembros, (Solute Carrier Family) que presenta alta expresión en células germinales.

ATN1 (Atrofina-1) es un correpresor de la transcripción, la cual recluta a NR2E1 para reprimir la transcripción. Promueve la migración y orientación celular de células vasculares lisas (VSMC) y es un correpresor de la actividad transcripcional de MG8. Posee actividad intrínseca de represión, la cual es independiente del número de repeticiones poli-Gln (o repeticiones poli-Q). PRKAB2 (Proteína cinasa activada por AMP, subunidad no catalítica 2) es activada por 5'-AMP beta-2, es una enzima codificada en el cromosoma 1 (1q21.1) aunque se conoce su expresión en células germinales y útero humano, se desconoce alguna función específica en el endometrio humano, mas allá de sus acciones generales en el metabolismo celular. LMNLN (Leishmanolysis-like) metallopeptidase M8 Family) codifica una proteína metalopeptidasa de Zinc, está involucrada en la migración e invasividad celular, existe evidencia en Drosophila de su papel en la progresión de la mitosis. Se han descrito algunas variantes alternativas, pero no tenemos conocimiento de alguna función específica en el epitelio endometrial.

PRKAB2 (protein kinase AMP-activated non catalytic subunit beta 2) es una proteína involucrada en vías de activación de enzimas mediante fosforilación, señalización de adipocitocinas, señalización mediada por AMPK, respuestas celulares al estrés y ritmos circadianos. LA PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR AMP, es un heterotrímero consistene de una subunidad alfa catalítica y dos subunidades no catalíticas, (Beta y Gamma). Ampk ES UNA IMPORTANTE enzima sensible a la energñia, que monitorea el estatus energñetico celular. En respuesta al estrñes metabòlico intracelular, se activa el AMPK, fosforilando y por lo tanto inactivando a la carboxilasa de acetil Coenzima A, (ACC) y a la beta-hidroxi-metil-glutarina Coenzima A reductasa (HMGCR), enzimas clave involucradas en la regulación de la síntesis de novo de los ácidos grasos y el colesterol. Esta subunidad beta 2podría ser un regulador positivo de la actividad de AMPK. Demuestra una elevada expresión en el músculo esquelético. En el contexto de la receptividad endometrial, se han descrito el importante papel del transporte feto materno de colesterol, ya que el embrión temprano carece de la maquinaria necesaria para su síntesis, y depende completamente de la síntesis materna.

MiRNAS CON DISMINUCIÓN DE EXPRESIÓN: miR-19a-5p, miR-139a-5p

Blancos moleculares y su función biológica: mir-19a-5p

KCNJ6 (canal rectificador de potasio) es una proteína activada por proteínas G, su mutación se asocia con el síndrome de Keppen-Lubinsky que ocasiona fallo en el crecimiento post natal, facies peculiar de aspecto envejecido (progeroide) lipodistrofia, microcefalia. Su función molecular es modular las concentraciones de potasio intracelular, tiene una actividad de puente de voltaje iónico. Se localiza como componente integral de la membrana en el aparato de Golgi. KCNJ6 esta involucrado en transporte iónico, al igual que la proteína GABRG-1, descrita previamente dentro de los blancos moleculares de miR-20a-3p, que regula canales de cloro. De esta forma encontramos una modulación por 2 diferentes miRNAs del clúster 17-92, de canales iónicos, uno es regulado a la baja por miR-20a (disminución del transporte de cloro) y el otro es regulado ala alta por miR-92, (canales de potasio).

SMCC03 (Structural maintenance of Chromosomes) son proteínas diméricas presentes en todos los organismos eucariontes que se encargan de mantener la estructura condensada de los cromosomas, para lo cual necesitan ATP, existen 3 tipos de proteínas SMC: las cohesinas, las condensinas y los miembros del complejo SMC5/6. La disminución del miR-19a, favorece el incremento de este tipo de proteínas fundamentales para el mantenimiento estructural de la cromatina en procesos de altos requerimientos energéticos como la implantación embrionaria y la gestación temprana.

HOXA6 (Caja Homeótica 6) es una proteína con actividad de factor de transcripción, se une al DNA, funciona como RNA polimerasa II no específica, y polimerasa II cis-reguladora. Se localiza en el núcleo celular y regula procesos biológicos tales como la morfogénesis embrionaria del sistema esquelético, desarrollo de organismos multicelulares regulando la transcripción.

TBC1 es un dominio evolutivamente conservado, se encuentra en las proteínas Tre2, Bub 2 y Cdc16, de ahí su nombre (TBC).

Blancos moleculares y su función biológica: mir-139a-5p

CDR1 (complementary-determining región 1) codifica una proteína CDR1, un ARN antisentido, es un gen representativo de los RNAs transcritos en antisentido a CDR1 (Cerebellar Degeneration- Related protein 1, 34 KDa). Algunos de estos RNA antisentido pueden ser circulares y presentan capacidad de unión o absorción de miRNAs como esponjas, impidiéndoles interactuar con los mRNA blanco.

C2C4D (C2 Calcium Dependent Domain Containing 4D) es una proteína con la función molecular de unión a fosfolípidos, dependiente de calcio. También presenta unión a clatrina, iones de calcio y syntaxina (sólo se expresa en células neoplásicas). Se ubica en la membrana plasmática, y el espacio presináptico. Participa en el transporte de vesículas medida por Calcio. Se fusiona con vesículas para regular la exocitosis de neurotransmisores mediante Calcio.

BLOC1S6 (Biogenesis of lysosomal organelles Complex Subunit 6) participa en el tráfico intracelular de vesículas, interactúa con Syntaxina 13, que regula la fusión intracelular de membranas. La mutación en BLOC ocasiona síntomas asociados al Síndrome Hermansky-Pudlak-9, existen múltiples transcritos obtenidos mediante splicing alternativo. Las vías metabólicas relacionadas son la emisión de vesículas en el sistema trans-Golgi, y el transporte de moléculas mediado por vesículas.

ANXA2R (Receptor 2 de Anexina). Las anexinas son un grupo de proteínas que modulan la actividad de la fosfolipasa A2, son proteínas que se activan con el Ca^{2++} , actúan como puentes de unión entre membranas que se fusionan. (Md Alauddin, Madhuris S., Salker and Florian Lang. Annexin A7 regulates endometrial receptivity). El silenciamiento de esta proteína disminuye significativamente la expresión de PRL e IGFBP1, considerados marcadores canónicos de decidualización. Además regula la actividad enzimática de COX2 para la generación de prostaglandinas, en particular PGE2. Las prostaglandinas son potentes reguladores de la receptividad

endometrial. Esta proteína se expresa en el tejido endometrial mostrando modificaciones significativas con la decidualización de las células del estroma endometrial (HESC's).

FNK3K (Ketosamine 3-kinase) Esta cinasa está involucrada en la deglicación de proteínas al mediar la fosforilación de ribuloselina y psicoselina en las proteínas glicadas para generar los metabolitos fosforilados y por tanto inactivar la función de estas proteínas glicadas, ya que se forman compuestos inestables de rápida degradación.

10.0 CONCLUSIONES

En el presente trabajo demostramos que el miR-191-5p induce en las células endometriales la expresión de cinco miRNA asociados a blancos moleculares involucrados en la receptividad endometrial en Homo sapiens. Los 5 miRNA descritos en el presente estudio regulan procesos biológicos críticos tales como el desarrollo embrionario, el ciclo celular y la proliferación celular. Recientemente, se

ha demostrado que estos miRNAs pueden inhibir la expresión de numerosas proteínas involucradas en el desarrollo tumoral, y poseen funciones cruciales durante la organogénesis, así como en la iniciación y el desarrollo de enfermedades humanas, incluido el cáncer. El presente estudio provee información con relación a moléculas que no se han estudiado en la ventana de implantación y que pudieran explicar posibles desenlaces adversos en los procesos de fertilización asistida.

11.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Teh WT, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(11):1419-30.
2. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:56.
3. Egashira M, Hirota Y. Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reprod Med Biol.* 2013;12(4):127-32.
4. Acuna-Gonzalez RJ, Olvera-Valencia M, Lopez-Canales JS, Lozano-Cuenca J, Osorio-Caballero M, Flores-Herrera H. MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021;19(1):109.
5. 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(Web Server issue):W273-6.
6. 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(10):1528-35.
7. Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update.* 2011;17(5):575-88.
8. Laufer N, Simon A. Recurrent implantation failure: current update and clinical approach to an ongoing challenge. *Fertil Steril.* 2012;97(5):1019-20.
9. Yoshinaga K. A historical review of blastocyst implantation research. *Biol Reprod.* 2018;99(1):175-95.
10. Chaen T, Konno T, Egashira M, Bai R, Nomura N, Nomura S, et al. Estrogen-dependent uterine secretion of osteopontin activates blastocyst adhesion competence. *PLoS One.* 2012;7(11):e48933.
11. Cheng JG, Rodriguez CI, Stewart CL. Control of uterine receptivity and embryo implantation by steroid hormone regulation of LIF production and LIF receptor activity: towards a molecular understanding of "the window of implantation". *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3(2):119-26.
12. Lim HJ, Dey SK. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res.* 2009;315(4):619-26.
13. Apparao KB, Illera MJ, Beyler SA, Olson GE, Osteen KG, Corjay MH, et al. Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod.* 2003;68(5):1484-90.
14. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004;25(3):341-73.
15. Liang J, Wang S, Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15(1):90.
16. Merrick WC. Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21197-201.
17. Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell.* 2018;172(3):393-407.
18. Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:355-76.

19. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
20. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 2014;157(1):77-94.
21. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.
22. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004;118(1):57-68.
23. Ellwanger DC, Buttner FA, Mewes HW, Stumpflen V. The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*. 2011;27(10):1346-50.
24. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(1):17-23.
25. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*. 2009;460(7254):479-86.
26. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*. 2012;336(6078):237-40.
27. Sohel MM, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS One*. 2013;8(11):e78505.
28. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-90.
29. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
30. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*. 2013;4:119.
31. Suh N, Belloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development*. 2011;138(9):1653-61.
32. Liu W, Niu Z, Li Q, Pang RT, Chiu PC, Yeung WS. MicroRNA and Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):263-71.
33. Matkovich SJ, Hu Y, Dorn GW, 2nd. Regulation of cardiac microRNAs by cardiac microRNAs. *Circ Res*. 2013;113(1):62-71.
34. Bourc'his D, Voinnet O. A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science*. 2010;330(6004):617-22.
35. 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(15):5141-51.
36. Malone CD, Brennecke J, Dus M, Stark A, McCombie WR, Sachidanandam R, et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*. 2009;137(3):522-35.
37. Chen L, Dahlstrom JE, Lee SH, Rangasamy D. Naturally occurring endo-siRNA silences LINE-1 retrotransposons in human cells through DNA methylation. *Epigenetics*. 2012;7(7):758-71.

38. Yao S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biol Proced Online*. 2016;18:8.
39. 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(5):843-54.
40. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.
41. Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev*. 1991;5(10):1813-24.
42. Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, et al. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(6):1765-71.
43. Strauss WM, Chen C, Lee CT, Ridzon D. Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm Genome*. 2006;17(8):833-40.
44. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*. 2003;5(2):351-8.
45. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*. 2005;19(4):489-501.
46. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blalock R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2007;39(3):380-5.
47. Johnson MH, McConnell JM. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(5):583-97.
48. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*. 2006;235(9):2301-14.
49. Ziomek CA, Johnson MH. Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell*. 1980;21(3):935-42.
50. Johnson MH, Ziomek CA. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol*. 1981;91(1):303-8.
51. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*. 1994;166(1):259-67.
52. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379-91.
53. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003;113(5):643-55.
54. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*. 2005;123(5):917-29.
55. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*. 2005;132(9):2093-102.

56. Ding XC, Slack FJ, Grosshans H. The let-7 microRNA interfaces extensively with the translation machinery to regulate cell differentiation. *Cell Cycle*. 2008;7(19):3083-90.
57. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell*. 2008;32(2):276-84.
58. Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA*. 2008;14(8):1539-49.
59. Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, et al. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol*. 2008;10(8):987-93.
60. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008;320(5872):97-100.
61. Yang Y, Wang YP, Li KB. MiRTif: a support vector machine-based microRNA target interaction filter. *BMC Bioinformatics*. 2008;9 Suppl 12:S4.
62. Chen A, Luo M, Yuan G, Yu J, Deng T, Zhang L, et al. Complementary analysis of microRNA and mRNA expression during phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced differentiation of HL-60 cells. *Biotechnol Lett*. 2008;30(12):2045-52.
63. Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2008;453(7192):223-7.
64. Flynt AS, Li N, Thatcher EJ, Solnica-Krezel L, Patton JG. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet*. 2007;39(2):259-63.
65. Wu L, Belasco JG. Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9198-208.
66. Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, Sthandier O, De Angelis FG, Marchioni M, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19849-54.
67. Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP. Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals. *Mol Biol Evol*. 2008;25(5):939-48.
68. Lu CW, Yabuuchi A, Chen L, Viswanathan S, Kim K, Daley GQ. Ras-MAPK signaling promotes trophectoderm formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet*. 2008;40(7):921-6.
69. Bortolin-Cavaille ML, Dance M, Weber M, Cavaille J. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(10):3464-73.
70. 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(18):3566-82.
71. Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, et al. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012;32(5):772-82.

72. Vaira V, Elli F, Forno I, Guarnieri V, Verdelli C, Ferrero S, et al. The microRNA cluster C19MC is deregulated in parathyroid tumours. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(2):115-24.
73. 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(12):4975-85.
74. Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, et al. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta.* 2012;33(9):725-34.
75. Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, Morelli AE, et al. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol Hum Reprod.* 2012;18(8):417-24.
76. Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Nelson DM, Parks WT, Sadovsky Y. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta.* 2010;31(9):781-4.
77. Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Bayer A, Ouyang Y, et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(29):12048-53.
78. Dai Y, Qiu Z, Diao Z, Shen L, Xue P, Sun H, et al. MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1. *Placenta.* 2012;33(10):824-9.
79. 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(19):3030-42.
80. 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(1):360-5.
81. 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(3):509-14.
82. Na YJ, Sung JH, Lee SC, Lee YJ, Choi YJ, Park WY, et al. Comprehensive analysis of microRNA-mRNA co-expression in circadian rhythm. *Exp Mol Med.* 2009;41(9):638-47.
83. Zhang L, Flygare J, Wong P, Lim B, Lodish HF. miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Riok3 and Mxi1. *Genes Dev.* 2011;25(2):119-24.
84. Cekaite L, Clancy T, Sioud M. Increased miR-21 expression during human monocyte differentiation into DCs. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010;2:818-28.
85. 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(1):83-7.
86. Luxford KA, Murphy CR. Cytoskeletal alterations in the microvilli of uterine epithelial cells during early pregnancy. *Acta Histochem.* 1989;87(2):131-6.
87. 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(5):1208-13.

88. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* 1997;2(2):84-93.
89. Koot YE, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(12):1943-50.
90. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 2012;18(12):1754-67.
91. Pope WF. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol Reprod.* 1988;39(5):999-1003.
92. 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(4):305-20.
93. Aplin JD. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. *Hum Reprod.* 1999;14 Suppl 2:17-25.
94. 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(1):190-9.
95. Murphy CR. The plasma membrane of uterine epithelial cells: structure and histochemistry. *Prog Histochem Cytochem.* 1993;27(3):1-66.
96. Nikas G. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod.* 1999;14 Suppl 2:37-44.
97. Kirn-Safran CB, Carson DD. Dynamics of uterine glycoconjugate expression and function. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999;17(3):217-27.
98. Lessey BA. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod.* 1998;13 Suppl 3:247-58; discussion 59-61.
99. 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(5605):405-8.
100. 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(1):12-9.
101. Rogers PA, Murphy CR. Morphometric and freeze fracture studies of human endometrium during the peri-implantation period. *Reprod Fertil Dev.* 1992;4(3):265-9.
102. Carson DD, DeSouza MM, Regisford EG. Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. *Bioessays.* 1998;20(7):577-83.
103. 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(3):229-34.
104. 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(6):1645-52.
105. 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(24):11408-12.
106. 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(7):3115-20.
107. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature.* 1992;359(6390):76-9.
108. Sengupta J, Lalitkumar PG, Najwa AR, Ghosh D. Monoclonal anti-leukemia inhibitory factor antibody inhibits blastocyst implantation in the rhesus monkey. *Contraception.* 2006;74(5):419-25.
109. Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update.* 2007;13(1):77-86.
110. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270(5235):467-70.
111. 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(6):2119-38.
112. 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(12):879-93.
113. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:339-55.
114. Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci.* 2002;7:d1879-98.
115. 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(9):871-9.
116. 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(8):2104-17.
117. 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(1):19-33.
118. 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(5):253-64.
119. 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(2):340-51.
120. 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(5):1133-43.

121. 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(1):19-27.
122. 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(3):818-24.
123. Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(3):121-9.
124. 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(4):1078-85.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
126. Colangelo V, Francois S, Solda G, Picco R, Roma F, Ginelli E, et al. Next-generation sequencing analysis of miRNA expression in control and FSHD myogenesis. *PLoS One*. 2014;9(10):e108411.
127. Hu Y, Lan W, Miller D. Next-Generation Sequencing for MicroRNA Expression Profile. *Methods Mol Biol*. 2017;1617:169-77.
128. Ji J, Shen L, Bootwalla M, Quindipan C, Tatarinova T, Maglinte DT, et al. A semiautomated whole-exome sequencing workflow leads to increased diagnostic yield and identification of novel candidate variants. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2019;5(2).
129. Kramer A, Green J, Pollard J, Jr., Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*. 2014;30(4):523-30.
130. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol*. 2007;8(9):R183.
131. Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1028-32.
132. Prasnikař E, Kunej T, Gorenjak M, Potocnik U, Kovacic B, Knez J. Transcriptomics of receptive endometrium in women with sonographic features of adenomyosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022;20(1):2.
133. Jabbour HN, Critchley HO. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction*. 2001;121(2):197-205.
134. Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*. 2014;5:472.
135. Houshdaran S, Zelenko Z, Irwin JC, Giudice LC. Human endometrial DNA methylome is cycle-dependent and is associated with gene expression regulation. *Mol Endocrinol*. 2014;28(7):1118-35.
136. Wang Y, Xue S, Liu X, Liu H, Hu T, Qiu X, et al. Analyses of Long Non-Coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing during the pre-implantation phases in pig endometrium. *Sci Rep*. 2016;6:20238.
137. Chen CH, Lu F, Yang WJ, Yang PE, Chen WM, Kang ST, et al. A novel platform for discovery of differentially expressed microRNAs in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2021;116(1):181-8.

138. Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*. 2012;18(3):262-7.
139. Jia SZ, Yang Y, Lang J, Sun P, Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2013;28(2):322-30.
140. Lu J, Zhang X, Zhang R, Ge Q. MicroRNA heterogeneity in endometrial cancer cell lines revealed by deep sequencing. *Oncol Lett*. 2015;10(6):3457-65.
141. Bellil H, Ghieh F, Hermel E, Mandon-Pepin B, Vialard F. Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic Clin Androl*. 2021;31(1):9.
142. Noctor G, Foyer CH. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1998;49:249-79.
143. Hardy MLM, Day ML, Morris MB. Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed In Vivo and In Vitro. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(21).
144. Dyve AB, Bergan J, Utskarpen A, Sandvig K. Sorting nexin 8 regulates endosome-to-Golgi transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(1):109-14.
145. Liu H, Huang X, Mor G, Liao A. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(11):2091-101.
146. Felici R, Lapucci A, Ramazzotti M, Chiarugi A. Insight into molecular and functional properties of NMNAT3 reveals new hints of NAD homeostasis within human mitochondria. *PLoS One*. 2013;8(10):e76938.
147. Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JR, Fusi L, Salker MS, et al. Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(4):273-85.
- 137 Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, et al. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation*. 2009;119(9):1263-1271.
- 138 Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN. Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules*. 2018;23(10):2564. Published 2018 Oct 8. doi:10.3390/molecules23102564
- 139 Bauer M, Kristensen BW, Meyer M, Gasser T, Widmer HR, Zimmer J, Ueffing M. Toxic effects of lipid-mediated gene transfer in ventral mesencephalic explant cultures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006 Apr;98(4):395-400.