



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Análisis comparativo de perfiles de expresión de miARNs
en el endometrio durante la ventana de receptividad: Una
revisión sistemática**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar al Grado Académico de Bachiller en Genética y
Biotecnología

AUTOR

Yvonne Mariana ARCOS GARCÍA

ASESOR

Mg. Gustavo Adolfo SANDOVAL PEÑA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Arcos, Y. (2021). *Análisis comparativo de perfiles de expresión de miARNs en el endometrio durante la ventana de receptividad: Una revisión sistemática*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Yvonne Mariana Arcos Garcia
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71434000
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5555-3521
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Gustavo Adolfo Sandoval Peña
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41020762
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8392-9880
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jaime Roberto Sánchez Venegas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06120091
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Ramirez Malaver
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43352480
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Lourdes Elena Arbaiza Prado
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07715318
Datos de investigación	
Línea de investigación	Reproducción
Grupo de investigación	No aplica

Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. “Programa de Promoción de Trabajos de Investigación para optar el grado de Bachiller”. B20100020b
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Latitud: -12.059736 Longitud: -77.082051
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020-2021
URL de disciplinas OCDE	Biología reproductiva: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00 Bioquímica, Biología Molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00 Otros temas en Biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER EN GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo las 08:12 horas del 08 de diciembre de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/diq-iqvh-gtk>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **YVONNE MARIANA ARCOS GARCIA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210066848, la graduanda expuso su Trabajo de Investigación: “**ANÁLISIS COMPARATIVO DE PERFILES DE EXPRESIÓN DE miARNs EN EL ENDOMETRIO DURANTE LA VENTANA DE RECEPTIVIDAD: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a **YVONNE MARIANA ARCOS GARCIA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 09:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 08 de diciembre de 2021.

Dr. JAIME SANCHEZ VENEGAS
(PRESIDENTE)



UNMSM

Firmado digitalmente por SANDOVAL
PEÑA Gustavo Adolfo FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.12.2021 09:31:21 -05:00

Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
(ASESOR)



UNMSM

Firmado digitalmente por RAMIREZ
MALAVER Jorge Luis FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.12.2021 09:33:21 -05:00

Dr. JORGE RAMIREZ MALAVER
(MIEMBRO)



UNMSM

Firmado digitalmente por ARBAIZA
PRADO Lourdes Elena FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.12.2021 09:37:26 -05:00

Blga. LOURDES ARBAIZA PRADO
(MIEMBRO)

El presente trabajo de investigación fue desarrollado gracias al apoyo financiero proporcionado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a través de la segunda convocatoria del Programa de Promoción de Trabajos de Investigación para optar el grado de Bachiller (Código: B20100020b).

Dedico este Trabajo de Investigación a-mi madre:

Alguna vez leerás estas palabras y quiero decirte que ninguna de ellas hubiera sido posible sin tu esfuerzo. Gracias por seguir intentando.

“Sé imparable, sé una fuerza de la naturaleza”

-C. Y.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Investigación ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas (¡muchísimas!) a las cuales -en este pequeño espacio- les agradezco infinitamente.

En primer lugar, a todos quienes en algún momento aportaron en la búsqueda del conocimiento, a los investigadores cuyas publicaciones hicieron posibles mares de nuevas ideas al compartir las suyas.

Asimismo, a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por haberme acogido durante estos años, gracias por compartir el legado de excelencia que nos asigna el gran reto de superarnos todos los días.

Sobre todo, a los profesores, quienes no solo imparten información, si no también fomentan el comportamiento científico a través de la curiosidad, por mostrar pasión por lo que hacen, lo cual me motivó a buscar qué es lo que me apasiona también, se aprende del ejemplo.

Especialmente al equipo del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, a todos y cada uno de ellos, por ser parte de mis primeros pasos en el mundo científico, por escuchar cada una de mis ideas y brindarme valiosos comentarios que considero han sido claves para crecer y madurar mi perspectiva, muchísimas gracias.

Finalmente, gracias también a ti lector, por tu curiosidad, espero que encuentres algo que te sea útil.

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

ADNc	ADN complementario
Drosha	Enzima involucrada en el procesamiento de miARNs
Dicer	Ribonucleasa celular
ERA	Prueba de receptividad endometrial
<i>Gold standard</i>	prueba de referencia
IMC	Índice de Masa Corporal
LAMP	Amplificación Isotérmica mediada por lazos
<i>loop</i>	lazo-horquilla
miARN	Micro ácido ribonucleico
(Micro) <i>Array</i>	matriz con sondas de hibridación. Uso: Análisis genético
nt	nucleótidos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pol	polimerasa
<i>primer</i>	cebador
RNA-seq	Herramienta para secuenciación masiva de ARN
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<i>stem</i>	tallo
TRA	Tecnologías de Reproducción Asistida
WOI	Ventana de implantación

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1. Delimitación del problema.....	- 1 -
1.3 Justificación	- 4 -
1.4. Objetivos	- 7 -
1.4.1. Objetivo general	- 7 -
1.4.2. Objetivos específicos:	- 7 -
1.5. Hipótesis	- 7 -
II. ESTADO DEL CONOCIMIENTO	- 8 -
2.1 La infertilidad.....	- 8 -
2.2 Los tratamientos para la infertilidad femenina	- 9 -
2.3 El endometrio	- 9 -
2.4 El ciclo menstrual.....	- 11 -
2.5 La receptividad endometrial y “La ventana de implantación”.....	- 12 -
2.6 Estimación del periodo receptivo: Uso de marcadores.....	- 13 -
2.6.1 Herramientas clásicas: Marcadores morfológicos	- 13 -
2.6.2 Marcadores moleculares y las tecnologías “ómicas”	- 18 -
III. MATERIALES Y MÉTODOS	- 25 -
3.1 Materiales	- 25 -
3.1.1 Obtención de la data	- 25 -
3.1.2 Herramientas bioinformáticas y criterios de análisis estadístico:	- 25 -
3.2 Metodología	- 27 -
3.2.1 Diseño experimental	- 27 -
IV. RESULTADOS	- 31 -
4.1 Selección de los estudios para la revisión sistemática	- 31 -
4.2 Estimación de la heterogeneidad de los estudios seleccionados	- 32 -
4.3. Análisis <i>in silico</i> de la data recolectada	- 36 -
a) Evaluación comparativa entre los miARNs diferencialmente expresados que fueron reportados.....	- 36 -
b) Análisis funcional de los miARNs seleccionados.....	- 39 -
c) Diseño de cebadores	- 42 -
V. DISCUSIÓN	- 46 -
VI. CONCLUSIONES	- 54 -
VII. RECOMENDACIONES	- 55 -
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 56 -
IX. ANEXOS	- 71 -

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación gráfica de la anatomía del útero	- 10 -
Figura 2. Representación de las regiones funcionalis y basalis del endometrio	- 10 -
Figura 3. Cambios en el endometrio a través del ciclo menstrual	- 12 -
Figura 4. Criterios de Noyes	- 14 -
Figura 5. Pinópodos de la superficie apical del endometrio humano durante el periodo receptivo	- 16 -
Figura 6. Las tecnologías ómicas	- 19 -
Figura 7. Ómicas y avances en Reproducción Asistida	- 19 -
Figura 8. Los miARNs se encontrarían involucrados en diversos procesos biológicos...	- 22 -
Figura 9. Representación gráfica de la interacción embrión-endometrio	- 22 -
Figura 10. Flujograma para las fases de selección de la información.	- 31 -
Figura 11. Diagrama de embudo.	- 34 -
Figura 12. Diagrama de Venn-Euler	- 37 -
Figura 13. Gráficas de barras análisis funcional en GeneCodis4-GO. para procesos biológicos relacionados a los miARNs.....	- 40 -
Figura 14. Gráficas de barras del análisis funcional en GeneCodis4-Reactome	- 40 -
Figura 15. Gráficas de barras del análisis funcional llevado a cabo en GeneCodis4-Panther en relación con las vías metabólicas asociadas.....	- 41 -
Figura 16. Gráficas de barras correspondientes al análisis funcional llevado a cabo en GeneCodis4-GO que muestran las localizaciones subcelulares más frecuentes de estos miARNs.....	- 41 -
Figura 17. Cebadores stem-loop RT-PCR para miR-199b-5p.....	- 43 -
Figura 18. Cebadores stem-loop RT-PCR para miR-345b-5p.....	- 43 -
Figura 19. Cebadores empleados como <i>templates</i> para la amplificación isotérmica de miARNs.....	- 44 -
Figura 20. Porcentaje de reincidencia de miARNs entre estudios independientes	- 73 -

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Análisis de la heterogeneidad y Diagrama de efectos para los factores "Edad materna" e "índice de Masa Corporal" de los estudios seleccionados.....	- 33 -
Tabla 2. Estudios incluidos según el protocolo de selección bibliográfica "PRISMA"	- 35 -
Tabla 3. Matriz con los miARNs diferencialmente expresados tanto en biopsias de tejido endometrial como en aspiraciones de fluido	- 38 -
Tabla 4. Matriz con los miARNs diferencialmente expresados exclusivamente en biopsias de fluido endometrial.	- 38 -
Tabla 5. Cebadores diseñados con miRPrimer seleccionados en base a su score.	- 42 -
Tabla 6. Cebadores diseñados según el modelo brindado por Li <i>et al.</i> (2011).....	- 44 -
Tabla 7. Lista de miARNs Diferencialmente expresados reportados según estudio, tipo de biopsia y método de detección	- 71 -
Tabla 8. Genes diana predichos a través de la plataforma Genecodis4 para las formas maduras de los miARNs seleccionados.	- 73 -

RESUMEN

La infertilidad es una condición que afecta tanto la salud reproductiva como el bienestar psicosocial de millones de personas. A lo largo del tiempo, se han realizado numerosos esfuerzos con el objetivo de optimizar los tratamientos disponibles para este problema, sin embargo, las tasas de éxito aún no son muy altas. A pesar de ello, diversos estudios en torno al endometrio han permitido caracterizar el momento idóneo para establecer un embarazo, durante el cual hay una comunicación sincrónica con el embrión que permitiría su implantación y progresión: el estado receptivo. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis comparativo de los perfiles de expresión de miARNs a partir de estudios reportados para biopsias de tejido y fluido endometrial durante la ventana de receptividad, con la finalidad de identificar de forma preliminar miARNs característicos de este periodo. Para ello, se realizó una revisión sistemática de literatura en la que se reportaban los perfiles de expresión de miARNs del endometrio receptivo, posteriormente se cotejaron de forma cualitativa en búsqueda de un consenso cuyos resultados se analizaron *in silico* mediante el uso de herramientas bioinformáticas, adicionalmente se diseñaron cebadores para estas secuencias. Los resultados mostraron a miR-199-5p y miR-345-5p como los miARNs más expresados entre los estudios evaluados para biopsias de endometrio como de fluido endometrial, las cuales estarían involucradas en procesos claves como la remodelación del endometrio a través de la decidualización, así como la angiogénesis y proliferación celular. Por lo tanto, se concluye que estas biomoléculas se podrían emplear para el desarrollo de técnicas de diagnóstico menos invasivas, no obstante, se sugiere validar los resultados de forma empírica.

Palabras clave:

Ventana de receptividad, biopsias de endometrio, miARN, detección molecular, revisión sistemática.

ABSTRACT

Infertility is a condition that affects both the reproductive health and psychosocial well-being of millions of people. Over time, numerous efforts have been made to optimize the available treatments for this problem, however the success rates are still not very high. Despite this, various studies on the endometrium have made it possible to characterize the ideal moment to establish a pregnancy, during which there is a synchronous communication with the embryo that would allow its implantation and progression: the receptive state. For this reason, the objective of this work was to perform a comparative analysis of miRNA expression profiles from studies reported for endometrial tissue and fluid biopsies during the receptivity window, to preliminarily identify characteristic miRNAs of this period. For this, a systematic review of the literature was carried out in which the expression profiles of miRNAs of the receptive endometrium were reported, later they were compared qualitatively in search of a consensus, the results of which were analyzed in silico using bioinformatic tools, additionally primers were designed for these sequences. The results showed miR-199-5p and miR-345-5p as the most expressed miRNAs among the studies evaluated for endometrial and endometrial fluid biopsies, which would be involved in key processes such as endometrial remodeling through decidualization, as well as angiogenesis and cell proliferation. Therefore, it is concluded that these biomolecules could be used for the development of less invasive diagnostic techniques, however, it is suggested to validate the results empirically.

Keywords:

Endometrial receptivity, endometrial biopsy, miRNA, molecular detection, systematic review

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Delimitación del problema

En la última década, la prevalencia de la infertilidad a nivel global es aproximadamente de 15%, esta se encuentra en aumento, por lo que representa un problema de salud pública que aqueja a millones de personas (Sun *et al.*, 2019). Existen muchos factores que contribuyen al desarrollo de esta condición, los cuales incluyen principalmente aspectos fisiológicos, genéticos, ambientales, sociales y psicológicos (Mascarenhas *et al.*, 2012).

Los tratamientos para la infertilidad comprenden un amplio espectro de opciones según los requerimientos de cada persona y pueden ir desde el uso de medicamentos hasta el apoyo mediante Técnicas de Reproducción Asistida (TRAs); sin embargo, el grado de éxito de estas últimas es muy variable y depende de la técnica empleada, las causas de la infertilidad, la edad de la mujer, entre otros aspectos; y aun así las bajas tasas de éxito sugieren que para optimizar estas técnicas se requiere una mayor comprensión de los eventos claves en la reproducción y la fisiología (ASMR, 2012; Cabrera *et al.*, 2020; Malhotra *et al.*, 2017).

Un suceso crítico que permitirá la progresión embrionaria y la consolidación del embarazo es la implantación, evento que demanda sincronía en la comunicación entre el embrión y el endometrio (Prieto-Gómez *et al.*, 2019). Precisamente, la implantación se lleva a cabo en el endometrio: tejido que recubre la cavidad uterina, el cual destaca por ser dinámico, ya que a lo largo del ciclo menstrual atraviesa de forma periódica fases secretoras y proliferativas, así como la menstruación (Carrascosa *et al.*, 2018).

La mayor parte del tiempo, el endometrio permanece en un estado “no adhesivo”; sin embargo, durante la fase secretora del ciclo, atraviesa un breve periodo de tiempo en el que aumentan sus propiedades adhesivas y manifiesta un fenotipo receptivo (Denker, 1993). Este estado transitorio permite la expresión de factores moleculares que facilitan la interacción del

trofoblasto y el epitelio endometrial, y con ello mediar un proceso de implantación exitoso (Franasiak *et al.*, 2016).

Los criterios para la caracterización del estado receptivo del tejido endometrial comprenden el avistamiento de marcadores morfológicos a través de pruebas histológicas, basados en los Criterios de Noyes, así como la presencia de pinópodos (Noyes *et al.*, 1950; Nikas, 2000). No obstante, la falta de precisión y consistencia de estas pruebas no permite discriminar verazmente el estatus receptivo del endometrio (Coutifaris *et al.*, 2004). En la actualidad, diversos campos de estudio con relación a la Medicina Reproductiva se encuentran en la búsqueda de marcadores que puedan identificar de forma certera este breve periodo receptivo, además de que estos puedan detectarse por medio de métodos menos invasivos que sugieran mayor comodidad para su uso a nivel clínico (Edgell *et al.*, 2013).

En esta última década, numerosos estudios apuntan hacia los elementos del secretoma endometrial, como los micro ácidos ribonucleicos (miARNs), ya que en trabajos recientes se ha evidenciado perfiles diferenciales de expresión de estos elementos entre las fases pre-receptivas y receptivas del endometrio (Garrido-Gómez *et al.*, 2013; Parks *et al.*, 2015). Los miARNs son elementos monocatenarios reguladores de la expresión genética asociados a la comunicación intercelular (Chen *et al.*, 2012). Además, estas moléculas pueden permanecer estructuralmente estables, característica que resalta su uso como potencial biomarcador (Chen *et al.*, 2008; Kosaka *et al.*, 2010). La detección de estos factores comprende un conjunto de técnicas moleculares complejas que requieren una gran inversión en equipamiento del laboratorio, así como tiempo de ejecución, por lo que muchas veces se tratan de pruebas altamente costosas que no pueden ser aplicadas de forma rutinaria a nivel clínico (Pellicer, 2005). Por ello, la creciente innovación tecnológica busca optimizar estas técnicas de detección a fin de encontrar alguna de alta sensibilidad, cuya ejecución sea de corta duración y a bajos costos, como la amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP) (Zhang *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta lo expuesto, el presente estudio busca realizar un análisis comparativo de los perfiles de expresión de miARNs en el endometrio que hayan sido reportados en la literatura científica para la identificación preliminar de potenciales biomarcadores con carácter pronóstico del periodo receptivo, diseñar elementos cebadores para su posterior detección mediante el uso de técnicas de amplificación de alta sensibilidad, y así contribuir al desarrollo de herramientas no invasivas complementarias que mejoren la capacidad de diagnóstico del estado receptivo del endometrio y su uso terapéutico a nivel clínico.

1.2. Pregunta del problema

Ante la problemática expuesta, la interrogante científica es si el análisis comparativo de los perfiles de expresión de miARNs reportados de biopsias endometriales durante la ventana de receptividad refleja miARNs característicos de esta etapa que puedan ser empleados como biomarcadores.

1.3 Justificación

La reproducción, característica fundamental de los seres vivos, es un proceso biológico complejo regulado por diversos factores que tienen por finalidad asegurar la perpetuidad de una especie (Audesirk *et al.*, 2011). Precisamente, el estudio de nuestra fisiología reproductiva nos revela la complejidad del microambiente en donde se llevan a cabo importantes acontecimientos como la fecundación, la implantación y la progresión embrionaria, en los que se muestra el carácter multifactorial del éxito reproductivo (Shahbazi, 2020).

Uno de estos eventos claves es la implantación embrionaria, la cual depende de la interacción recíproca entre un embrión competente y el endometrio receptivo (Gutiérrez, 2019). Existen muchos factores involucrados en la progresión de esta etapa, entre ellos los miARN, como elementos reguladores de la expresión genética presentes en el secretoma endometrial, tendrían la función de facilitar la comunicación, modular el microambiente y brindar información sobre las condiciones fisiológicas de este (Galliano *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2017).

De hecho, este suceso es considerado decisivo para establecer un embarazo, por lo que cualquier fallo en esta etapa es todo un reto que superar para la Medicina Reproductiva y los tratamientos para la infertilidad, entre los que se encuentran las Técnicas de Reproducción Asistida (TRAs) (Gutiérrez, 2019).

Debido a que se lleva a cabo en el endometrio, la evaluación clínica de su fisiología es primordial para precisar si es idóneo a recibir al embrión (Gutiérrez, 2019). Por lo que se necesitan marcadores de carácter pronóstico confiables con los cuales identificar adecuadamente la ventana de receptividad.

En vista de la inconsistencia en el dataje histológico al emplear marcadores morfológicos, lo invasivo de la toma de muestras y la subjetividad de su interpretación; el desarrollo de las

tecnologías ómicas brinda un amplio espectro de posibilidades para la identificación del estado receptivo del endometrio (Coutifaris *et al.*, 2004; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011). Entre ellos, los miARNs destacan por ser moléculas que pueden permanecer en conformaciones estables a nivel extracelular, y encontrarse en una gran variedad de fluidos: sangre, orina, e inclusive fluidos provenientes del útero, lo cual sugiere su potencial uso como biomarcador no invasivo (Weber *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012)

Adicionalmente, los miARNs se encuentran relacionados a la regulación de múltiples procesos biológicos de alta relevancia como la oogénesis, la fecundación, implantación y formación de la placenta, por lo que su estudio también nos podría brindar información sobre el estado fisiopatológico de la madre, así como de la progresión del embarazo (Hossain *et al.*, 2012; Hernández-Vargas *et al.*, 2020).

Con respecto a los métodos de detección de miARNs, estos generalmente suelen incidir en el uso de técnicas moleculares complejas que requieren una considerable inversión en tiempo de ejecución y análisis de resultados, sin considerar el costoso equipamiento y la capacitación adecuada del personal que obstaculiza su aplicabilidad a nivel clínico (Ouyang *et al.*, 2019).

Gracias al constante desarrollo tecnológico, en la actualidad tenemos una gran diversidad de herramientas como la amplificación isotérmica mediada por lazo (Notomi *et al.*, 2000). Este método de amplificación de ácidos nucleicos cobra especial importancia en el campo de diagnóstico clínico por ser una metodología altamente sensible que permite resultados en menos tiempo a una temperatura estable (Dhama *et al.*, 2014).

Por otro lado, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de nuestro país: ALICIA (última revisión 24 de abril del 2021), no se hallan trabajos de investigación en relación con el uso de esta metodología de amplificación para la detección de la ventana de receptividad endometrial ni del uso de los miARNs para establecer un perfil de expresión diferencial del estado receptivo de este tejido en la población peruana.

Por lo tanto, en este estudio se plantea un análisis comparativo de perfiles de expresión de miARNs a partir de estudios reportados para biopsias de tejido y fluido endometrial durante el periodo receptivo con la finalidad de contribuir en la identificación preliminar de potenciales biomarcadores de esta breve etapa, así como el diseño de cebadores para su detección mediante metodologías de amplificación isotérmica mediada por lazo, y con ello expandir el número de herramientas disponibles para determinar la ventana de receptividad del endometrio.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Realizar un análisis comparativo de los perfiles de expresión de miARNs reportados para biopsias de tejido y fluido endometrial durante la ventana de receptividad.

1.4.2. Objetivos específicos:

- Realizar una revisión sistemática de estudios que reporten perfiles de expresión de miARNs del endometrio durante la ventana de receptividad.
- Evidenciar los procesos biológicos relacionados a los miARNs seleccionados por medio de herramientas bioinformáticas.
- Diseñar cebadores para la detección de los miARNs seleccionados mediante técnicas de amplificación de alta sensibilidad.

1.5. Hipótesis

H₁: La comparación de perfiles de expresión de miARNs reportados en la literatura científica seleccionada para biopsias endometriales en fase receptiva muestra miARNs coincidentes.

H₀: La comparación de perfiles de expresión de miARNs reportados en la literatura científica seleccionada para biopsias endometriales en fase receptiva no muestran miARNs coincidentes.

II. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

2.1 La infertilidad

En el caso de los humanos, la infertilidad de una pareja está definida clínicamente como la incapacidad de lograr el embarazo después de doce meses de tener relaciones sexuales sin emplear métodos anticonceptivos (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Las causas de la infertilidad son variadas: alrededor del 30% se encuentra asociado al factor femenino, un 30% al factor masculino, de lo restante se pueden tratar de causas combinadas o de casos de infertilidad idiopática (Ramirez Moran *et al.*, 2019).

A nivel global, según Sun *et al.* (2017) “la prevalencia de esta condición afecta alrededor del 15% de las parejas en edad reproductiva”. Las cifras se encuentran en aumento cada año, por lo que la infertilidad se considera un problema de salud pública (Sun *et al.*, 2017; Macaluso *et al.*, 2010). Esta suma se ve incrementada si se le añaden desórdenes de origen anatómico, endocrino, genético e inclusive factores como la edad, índice de masa corporal y hábitos que puedan repercutir en su salud reproductiva (McLaren, 2012).

En el Perú, país en vías de desarrollo, la incidencia de este problema ha ido en ascenso producto de otros factores como la pobreza, estilo de vida, contaminación ambiental y como consecuencia indirecta de enfermedades tales como el cáncer, la obesidad e inclusive el estrés. (Roa-Meggo, 2012). A pesar de que esta situación afecta el bienestar psicosocial de muchas personas, en la actualidad la infertilidad no está considerada dentro del enfoque preventivo por no ser transmisible o comprometer la vida de quien la padezca (Roa-Meggo, 2012).

2.2 Los tratamientos para la infertilidad femenina

Frente a cuadros de infertilidad femenina, en la actualidad existe una amplia gama de tratamientos que buscan restaurar la fertilidad: cambio de hábitos, medicamentos, cirugía, e inclusive tratamientos más complejos como las distintas técnicas de reproducción asistida (Babieri, 2019). De hecho, estas últimas también son muy variadas y van, entre otras, desde la inseminación artificial hasta la maternidad subrogada, dependiendo de la necesidad particular de los pacientes (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009)

Entre los factores que influyen la determinación del éxito de los tratamientos, lograr un adecuado proceso de implantación es de los más importantes (Salamonsen *et al.*, 2016). Este evento ocurre en el endometrio, el cual según Babieri (2019) y Gutierrez (2019) se trata de un “activo participante” ya que en él se lleva a cabo la comunicación con el embrión, así como su interacción con los factores inmunológicos maternos y demás elementos que permitirían la adhesión e invasión embrionaria.

2.3 El endometrio

Según el libro escrito por Carlos Simón (2009), el endometrio humano es el tejido que tapiza la cavidad uterina y su importancia reside en ser el lugar en donde se lleva a cabo la implantación y desarrollo embrionario. Anatómicamente, este tejido está constituido por una región *funcionalis* dinámica durante el periodo menstrual y otra región denominada *basalis* actúa como soporte del endometrio (Simón, 2009; Carrascosa *et al.*, 2018).

El endometrio también está compuesto por los compartimientos epitelial, estromal y vascular, además de diferentes factores del sistema inmune, elementos bioquímicos que median la comunicación y una microbiota activa quienes conforman el complejo ambiente en el que interactuará el embrión (Simón, 2009; Franasiak & Scott, 2017).

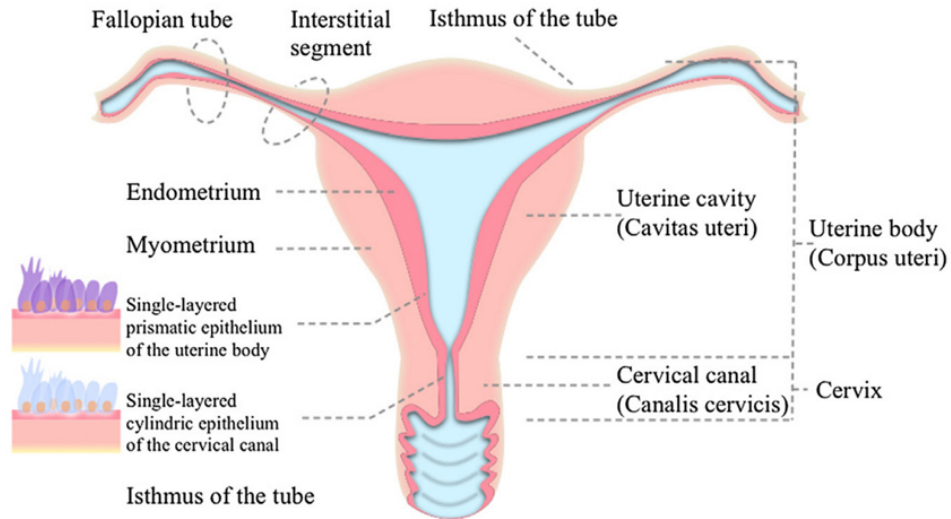


Figura 1. Representación gráfica de la anatomía del útero (Fuente: Carrascosa *et al.*, 2018).

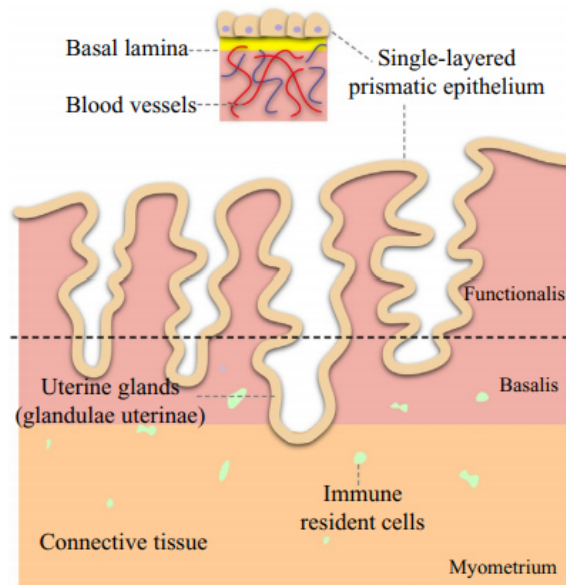


Figura 2. Representación esquemática de las regiones *funcionalis* y *basalis* del endometrio (Fuente: Carrascosa *et al.*, 2018).

2.4 El ciclo menstrual

El ciclo menstrual es característico de muy pocas especies en etapa reproductiva, como los seres humanos y algunos primates, en comparación con el ciclo estral que presentan muchos otros mamíferos, quienes pueden mantener su endometrio en fase secretora por más tiempo, así como también reabsorben este tejido y lo regeneran de forma periódica (Mihm *et al.*, 2010).

Las diferencias entre el ciclo menstrual y el ciclo estral se deben principalmente al menor costo metabólico de la fase menstrual en comparación al mantenimiento y reabsorción del endometrio a lo largo del ciclo estral, y a la frecuencia de los ciclos: mientras que el ciclo menstrual suele presentar una periodicidad cuasi mensual, en el ciclo estral hay muchos factores que pueden influenciar su periodicidad dependiendo de la especie (Papanicolau, 1923; Strassmann, 1996)

A lo largo del ciclo menstrual, el endometrio humano atraviesa diversos cambios cíclicos controlados por las fluctuaciones hormonales (Mihm *et al.*, 2010). Estos cambios inician en la menstruación, evento en el cual la capa *funcionalis* del endometrio se desprende y se elimina en forma de sangrado (Maybin & Critchley, 2015; Carrascosa *et al.*, 2018). En consecuencia, la capa *basalis* remanente lo regenera y engrosa durante la fase proliferativa en respuesta al incremento de estrógenos provenientes del ovario que paralelamente cursa la fase folicular de su correspondiente ciclo ovárico (Ferenczy *et al.*, 1979; Carrascosa *et al.*, 2018).

Finalmente, en la fase secretora, el endometrio sufre una remodelación producto de la diferenciación de sus células en grupos glandulares y estromales (Mihm *et al.*, 2010). Este último grupo pasa por una importante transformación producto del pico de progesterona: la decidualización que, junto con la secreción de diferentes factores bioquímicos, preparan la interacción con un futuro embrión y mediando el proceso de implantación (Gellersen *et al.*, 2007; Mihm *et al.*, 2010). En caso contrario, los picos hormonales caen, la secreción cesa, la

capa *funcionalis* comienza a degenerarse y el ciclo comienza otra vez (Hawkins & Matzuk, 2008).

Con relación a lo mencionado, Greening *et al.* (2016) presentan una gráfica en donde se evidencia la influencia de las hormonas esteroideas en el dinamismo del endometrio durante el ciclo menstrual.

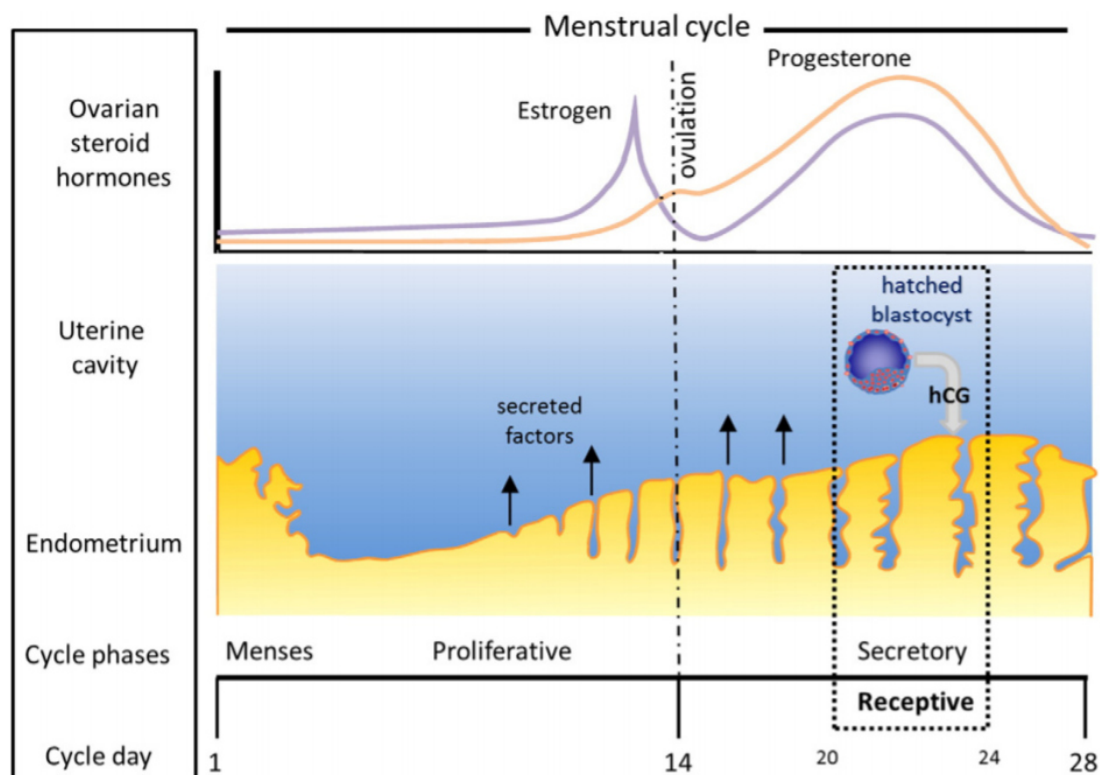


Figura 3. Cambios en el endometrio a través del ciclo menstrual, se destaca la ventana de receptividad durante la fase secretora. (Fuente: Greening *et al.*, 2016).

2.5 La receptividad endometrial y “La ventana de implantación”

Durante la fase secretora, el endometrio atraviesa un breve lapso en el que manifiesta un fenotipo receptivo, comúnmente conocido como “la ventana de implantación”, debido a que se caracteriza por llevar a cabo una serie de complejos cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos con el objetivo de volver al endometrio competente para mediar el proceso de implantación embrionaria (Rashid *et al.*, 2011; López-Luna *et al.*, 2019).

La receptividad como tal es considerada “un aspecto clave” para lograr una interacción sincrónica entre el embrión y microambiente endometrial en estado “adhesivo”, y así conseguir un embarazo exitoso (López-Luna *et al.*, 2019; Prieto *et al.*, 2019). Aun así, la identificación de este estado transitorio sigue siendo uno de los grandes retos en el campo de la Medicina Reproductiva sobre todo por su impacto en la optimización de las diferentes técnicas de reproducción asistida (Edgell *et al.*, 2013; Fatemi & Popovic-Todorovic, 2013).

2.6 Estimación del periodo receptivo: Uso de marcadores

La estimación de la receptividad endometrial es una tarea compleja debido a que el tiempo de duración de este estado es breve y variable entre mujeres, el cual generalmente va de 12 a 48 horas (Franasiak *et al.*, 2016). Por ello se han hecho numerosos esfuerzos para buscar marcadores que puedan caracterizar con precisión el periodo receptivo (Achache & Revel, 2006). De hecho, en la actualidad hay una gran diversidad de elementos que han sido empleados como marcadores a través del tiempo; sin embargo, debido a que muchos de ellos no brindan resultados consistentes ni representativos del estado receptivo, aún se buscan nuevos potenciales marcadores que sean útiles en el ámbito clínico (Díaz-Gimeno *et al.*, 2011; Edgell *et al.*, 2013).

2.6.1 Herramientas clásicas: Marcadores morfológicos

- **El ciclo endometrial desde una perspectiva histológica: Los criterios de Noyes**

En la década de los años 50's, los criterios para identificación de las fases del ciclo endometrial se basaban en marcadores histológicos de carácter descriptivo propuestos por Noyes *et al.* (1950): la mitosis glandular, la pseudoestratificación de los núcleos y mitosis estromal como indicadores de la fase proliferativa, este último criterio también estaría presente en menor medida finalizando la fase secretora, mientras que la presencia de vacuolas basales post ovulación, la secreción activa en el lumen glandular y el edema

estromal serían indicadores de la fase secretora como tal, la reacción pseudodecidual e infiltración de leucocitos tendrían lugar antes de la menstruación.

A continuación, se muestra un extracto con estos ocho criterios histológicos establecidos por Noyes *et al.* (1950), quienes al asociarlos con la temperatura basal lograron instaurar un método para el dataje del ciclo endometrial.

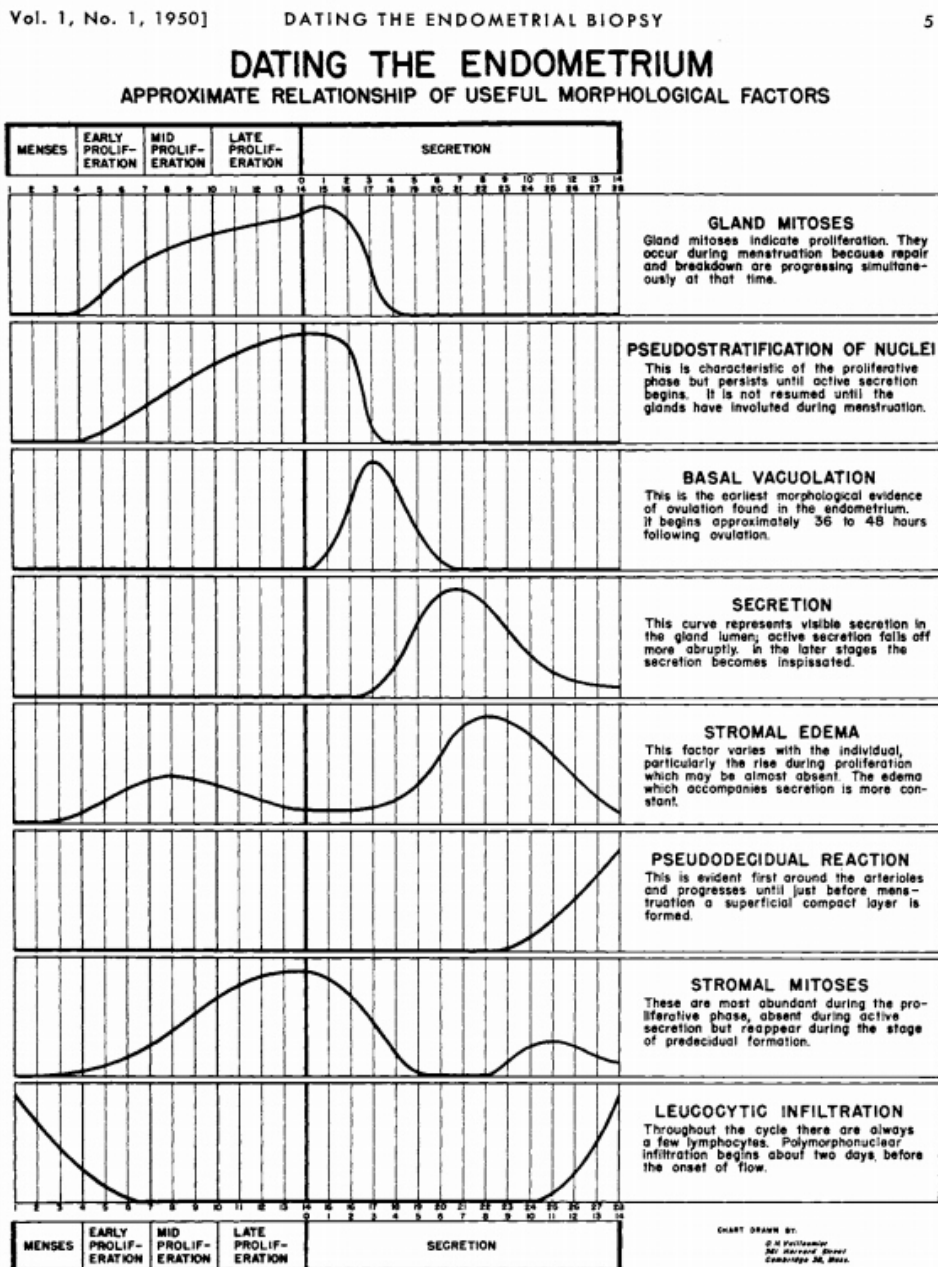


Figura 4. Criterios establecidos por Noyes *et al.* para la evaluación de biopsias endometriales (Fuente: Noyes *et al.*, 1950)

De hecho, la introducción de este método de evaluación del endometrio en el ámbito clínico lo ha establecido como *gold standard* no solo para el dataje endometrial, sino en la detección de anomalías de carácter patológico (Diedrich *et al.*, 2007). No obstante, esta técnica presenta numerosas limitaciones que fueron evidenciadas con el paso de los años. En primera instancia, estudios llevados por Coutifaris *et al.* (2004), al igual que Murray *et al.* (2004), discutieron la controversial precisión de este método desde la obtención de la muestra, su procesamiento y a la subjetividad de la interpretación, así como el dataje empleando de referencia un estimador muy variable como la temperatura basal en vez de algún marcador objetivo hormonal como la hormona luteinizante (LH) cuyo pico se da durante la ovulación. Finalmente, ambos estudios concuerdan que no se trataría de un método de aporte información de utilidad clínica y no debería ser empleado como herramienta para la estimación de la receptividad endometrial.

- **Cambios en la superficie celular durante el periodo receptivo: *Los pinópodos***

Uno de los marcadores morfológicos más resaltantes son los pinópodos: largas protrusiones ectoplasmáticas que se forman en las células secretoras endometriales durante el periodo receptivo, las cuales fueron documentadas por el Dr. George Nikas (2000) empleando biopsias endometriales y un microscopio electrónico de barrido.

A pesar de que la bibliografía respalda la presencia de estas estructuras, su duración aún es controversial, lo cual afecta su reproducibilidad y veracidad como predictor de la receptividad, por lo cual no debe ser empleado como biomarcador (Quinn & Casper, 2009).

Cabe resaltar que la metodología de detección basada en microscopía electrónica de barrido y en biopsias endometriales elevan los costos y disminuyen su potencial aplicabilidad a nivel clínico. Es más, los estudios llevados por Coutifaris *et al.* (2004) y por Murray *et al.* (2004) también concluyen que las biopsias de endometrio, además de ser técnicas invasivas, no brindan suficiente información que se considere útil debido a que tienen una alta prevalencia a ser tomadas “fuera de fase” y por ello tienden a producir errores, aseveración actualmente

respaldada por la American Society for Reproductive Medicine - ASRM (2015) quienes tampoco recomiendan su uso para estimar las fases del ciclo endometrial.

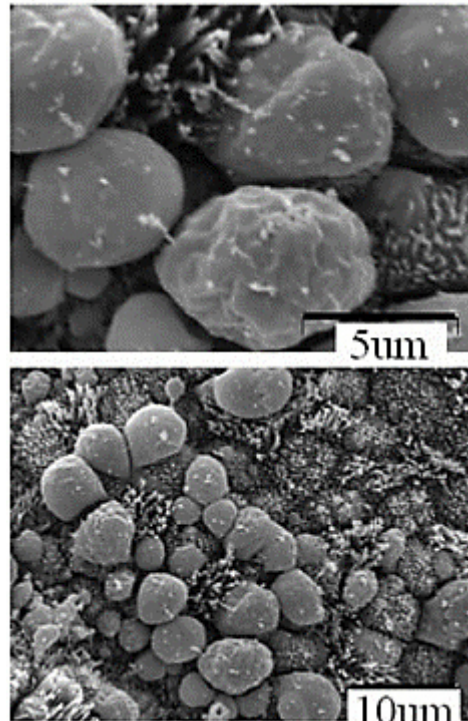


Figura 5. Pinópodos de la superficie apical del endometrio humano durante el periodo receptivo (LH+7). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Fuente: Quinn & Casper, 2009).

- **El sonido como herramienta de diagnóstico no invasiva: Usos de la ecografía**

La ultrasonografía, comúnmente conocida como ecografía, es una técnica que emplea el uso de ondas de sonido de alta frecuencia “ultrasonidos” para recrear imágenes en tiempo real (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2007). Este método se basa en la reflexión del sonido al chocar con los órganos y tejidos, y así permitir su exploración (Gil, 2008).

Actualmente existen diferentes tipos de ultrasonidos de uso ginecológico como el ultrasonido bidimensional, tridimensional, ecografías de alta definición en tiempo real, ecografías Doppler pulsado y a color, de infusión salina entre muchas otras más (Cakmak & Taylor, 2012). Esta variedad también se aplica al modo de aplicación de la técnica, que puede ser superficial o transvaginal (Cakmak & Taylor, 2012).

Entre los predictores propuestos se encuentran criterios anatómicos como el grosor y el patrón o textura del endometrio, así como un criterio fisiológico: la perfusión sanguínea endometrial (Fiedler *et al.*, 1996).

Si bien se trata de una técnica mucho menos invasiva, de corta duración y rápida obtención de resultados, varios estudios de revisión retrospectiva como el llevado a cabo por Fiedler *et al.* (1996) muestran que los resultados eran controversiales y señalaban que el valor predictivo de los criterios aún no era lo suficientemente confiable como para estimar algo tan complejo como la receptividad endometrial.

Nuevos estudios prospectivos se realizaron con la finalidad de poder evaluar si algunos de estos criterios morfológicos detectados por ultrasonido podrían ayudar a tener un pronóstico del éxito de fertilizaciones *in vitro*, sin embargo, ningún criterio podía ayudar a estimar los resultados (Schild *et al.*, 2001).

En la última década Hakan Cakmak y Hugh Taylor (2012) también mencionan que a pesar de que los criterios morfológicos enfocados en la determinación de la receptividad endometrial aún carecen de especificidad y consistencia, la tecnología de ultrasonido finalmente si brinda información relevante a nivel clínico sobre todo en la detección de patologías ginecológicas que puedan estar afectando su fertilidad, probablemente los nuevos avances en el campo de la Imagenología, como las ecografías penta-dimensionales (5D), pronto permitan llegar a un consenso y ser aplicables para optimizar las técnicas de Reproducción Asistida (Elsokkary *et al.*, 2019).

2.6.2 Marcadores moleculares y las tecnologías “ómicas”

Gracias a los extraordinarios avances de la Biología Molecular en las últimas décadas se pudieron identificar una gran cantidad de biomoléculas que permiten discriminar objetivamente rasgos de particular interés tanto cualitativamente mediante la dicotomía presencia/ausencia como cuantitativamente midiendo los niveles de expresión (Solís & Andrade, 2005; Grover & Sharma, 2016). Las biomoléculas seleccionadas con este fin son denominadas “marcadores moleculares” y hoy en día tenemos un surtido número de estos marcadores según su naturaleza bioquímica, función biológica y tecnología de detección (Grover & Sharma, 2016).

Por la complejidad fisiológica propia del endometrio, las tecnologías ómicas no solo se suman en la búsqueda de marcadores con los cuales se pueda discriminar entre las fases del ciclo endometrial y *per se* su estado receptivo, sino también apoya al diagnóstico de cuadros patológicos complejos como el cáncer o la endometriosis (Egea *et al.*, 2014; Saare *et al.*, 2017). Es más, actualmente se apunta al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico menos invasivos basados en estas tecnologías y así lograr una mejor integración en el ámbito clínico (Edgell *et al.*, 2013).

A continuación, se muestran dos esquemas en los cuales se puede observar la aplicación de diferentes tecnologías ómicas en la integración de la información proveniente de diferentes dimensiones: genética, bioquímica y sus interacciones metabólicas, y así poder ayudar a lograr una mayor comprensión fisiológica de estas complejas estructuras (Hernández-Vargas *et al.*, 2020).

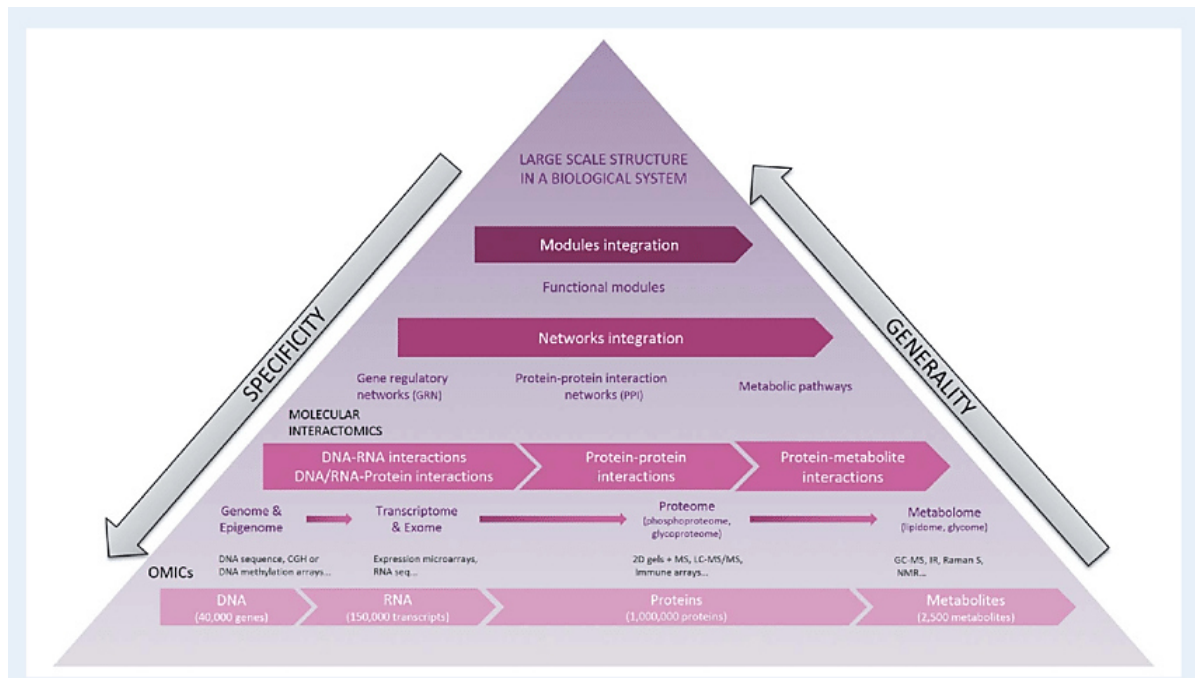


Figura 6. Las tecnologías ómicas aportan en la comprensión de la compleja fisiología de estructuras como el endometrio humano (Fuente: Hernández-Vargas *et al.*, 2020).

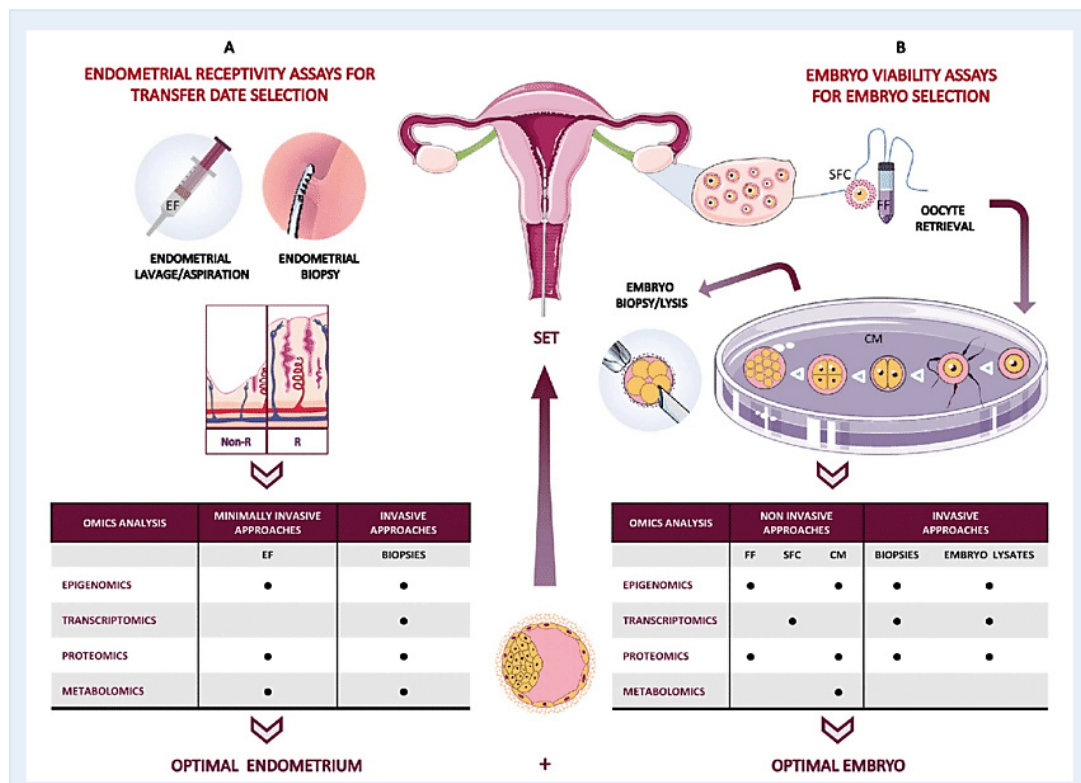


Figura 7. Los avances actuales buscan determinar la competencia del embrión como el periodo receptivo del endometrio para aumentar la probabilidad de una implantación exitosa (Fuente: Hernández-Vargas *et al.*, 2020).

Según la revisión sistemática llevada a cabo por Hernández-Vargas *et al.* (2020) respecto al empleo de las tecnologías multi-ómicas para la identificación de biomarcadores, como se observa en la figura anterior, a lo largo del tiempo se han realizado numerosos esfuerzos por establecer biomarcadores con los cuales poder discriminar al endometrio receptivo.

Los avances en Transcriptómica permitieron el desarrollo de la primera herramienta diagnóstica de la receptividad endometrial: la prueba “ERA” (del inglés, *Endometrial Receptivity Array*), basada en el diseño de un *microarray* con genes diferencialmente expresados entre las fases del ciclo endometrial (Díaz-Gimeno *et al.*, 2011); en la actualidad aún se procura buscar formas menos invasivas y que sean de provecho para la Medicina Reproductiva.

Esta herramienta es de gran utilidad por su valor predictivo hasta cierto punto, debido a que todavía presenta algunas desventajas: es una técnica invasiva ya que requieren biopsias de endometrio, es altamente costosa no solo porque emplea matrices para *microarrays* de un solo uso, sino porque también necesita el equipamiento adecuado en el laboratorio para ejecutar esta técnica, y su uso a nivel clínico puede limitar la posibilidad de realizar una transferencia de embriones durante ese ciclo por lo que no se puede aplicar de forma rutinaria en los tratamientos de infertilidad (Carrascosa *et al.*, 2018).

De forma similar, el endometrio humano ha sido explorado cuantiosamente a nivel proteómico, el cual se trata de un complejo campo que muestra perfiles diferenciales de expresión proteica tanto entre fases del ciclo endometrial como en pacientes sometidos a alguna forma de estimulación durante su tratamiento para la infertilidad, entre estas proteínas destacan diversas citoquinas, receptores, integrinas y factores de crecimiento (Hernández-Vargas *et al.*, 2020). Aun así, entre sus principales obstáculos resaltan las metodologías de detección limitadas, complicado aislamiento de las proteínas obtenidas y el uso de biopsias endometriales, aunque este último está cambiando a una muestra menos invasiva: el secretoma del fluido endometrial (Li & Jin, 2013; Kasvandik *et al.*, 2019).

En pocas palabras, el fluido endometrial estaría compuesto por los elementos secretados como diversas proteínas, lípidos, algunos glúcidos, iones e inclusive elementos de regulación genética como los miARNs, pequeñas biomoléculas descritas a continuación (Bhusane *et al.*, 2016; He *et al.*, 2021).

Cabe destacar que el fluido endometrial, conocido también como fluido uterino o moco cervical, se ha convertido en el nuevo foco de investigación en la búsqueda de herramientas menos invasivas por su sencilla colección mediante un aspirado (Cheong *et al.*, 2013). Esta muestra es el primer contacto que tendría el embrión con el ambiente materno y en su composición se encontrarían los elementos que estarían involucrados en su comunicación recíproca (Bhusane *et al.*, 2016).

- **Los miARNs: A la búsqueda de potenciales biomarcadores**

Los micro ácidos ribonucleicos (miARNs) son pequeñas secuencias de ARN no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión genética (Ha & Kim, 2014). En el endometrio, los miARNs estarían involucrados en diversos procesos biológicos como la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular, claves para la remodelación morfológica que atraviesa a lo largo de su ciclo (Pan & Chegini, 2008; Hull & Nisenblat, 2013).

Su origen es complejo, de hecho, en humanos se han localizado a lo largo de todo el genoma tanto en regiones intrónicas como exónicas (Ha & Kim, 2014). Por otro lado, según Paul *et al.* (2018) estos miARNs se diferencian de otros tipos de ARNs pequeños no codificantes según su biogénesis: los miARNs provienen de pequeñas horquillas formadas por ARN de cadena simple que fueron procesados por las enzimas Drosha y Dicer.

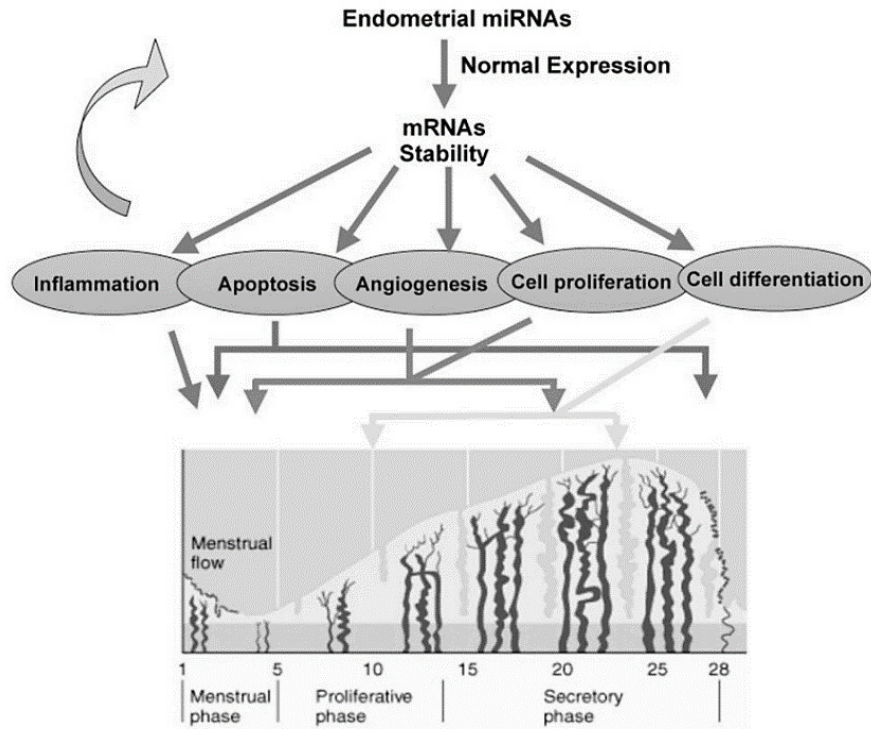


Figura 8. Esquema de algunos procesos biológicos en los que se encuentran involucrados los miARNs (Fuente: Pan & Chegini, 2008).

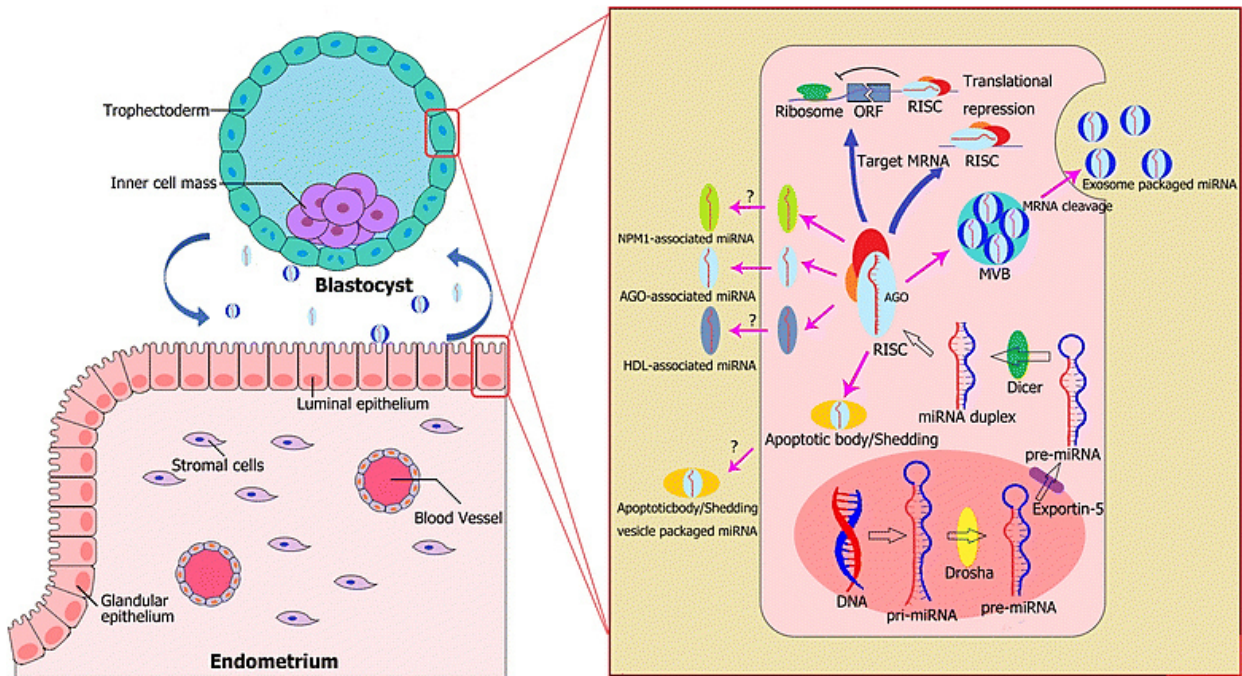


Figura 9. Representación gráfica con las posibles interacciones moleculares entre el embrión y el endometrio (Fuente: Liang *et al.*, 2017)

A la fecha se han realizado diferentes estudios en los que se evaluaba la participación de los miARNs en el endometrio, de ellos se destaca la evidencia de perfiles diferenciales de expresión entre las fases del ciclo, así como su rol en procesos de decidualización del endometrio y fomentando un entorno inmunotolerante (Sha *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2018). Asimismo, se resalta la posibilidad de discriminar entre pacientes fértiles de aquellos que presentan desórdenes endometriales como cáncer, endometriosis, pérdidas recurrentes, entre otros (Pan & Chegini, 2008).

La caracterización de miARNs a nivel extracelular es relativamente reciente y se ha encontrado en una diversidad de fluidos como orina, sangre periférica, saliva, e inclusive en muestras de fluido endometrial, este hecho, junto a que son moléculas que permanecen estructuralmente estables en esos medios se plantea su uso como biomarcadores (Liang *et al.*, 2017).

La detección de miARNs extracelulares también es respaldada por Vilella *et al.* (2015), quienes evidenciaron empíricamente la presencia de miARNs asociados a exosomas en pequeñas muestras de fluido endometrial durante la ventana de implantación y proponen una vía de comunicación endometrio-embrión mediante la internalización de estas pequeñas moléculas.

Los métodos de detección actuales comprenden técnicas “tradicionales” como el uso de *microarrays*, RNA-seq, Northern blots, RT-qPCR, secuenciación de segunda generación (NGS), los cuales presentan algunas limitaciones: requieren cuantiosas muestras (generalmente biopsias) e inclusive algún pretratamiento como el aislamiento y retrotranscripción del ARN, son costosas, demandan mucho tiempo, por ello muchas veces no se incorporan como pruebas de rutina en el ámbito clínico (Koshiol *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2017).

En la actualidad, algunos de los inconvenientes mencionados pueden ser superados mediante un cambio metodológico. Una alternativa podría ser la detección de miARNs de una

muestra limitada como el fluido endometrial que podría ser llevada a cabo por medio de amplificaciones isotérmicas mediadas por lazos (LAMP-PCR), método relativamente reciente que manifiesta ser más sensible que muchos métodos convencionales, de menores costos, de rápida ejecución e interpretación de resultados más sencillos, y de forma global se trataría de una técnica más rentable para el uso clínico (Deng *et al.*, 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Obtención de la data

Para el desarrollo de este estudio se empleó la información de perfiles de expresión de miARNs seleccionadas producto de la revisión sistemática de bibliografía bajo los criterios de elegibilidad detallados en la metodología, estos sustancialmente se tratan de ensayos de análisis transcriptómico entre mujeres en edad reproductiva, con evidencia de fertilidad.

Las consideraciones sobre la privacidad y tratamiento de la data empleada siguen las normas de bioética establecidas por diversos comités de ética (Barrios *et al.*, 2011) y normas sobre la ética en la investigación MINSa (2011); así mismo, se destaca el uso de información de acceso público con fines de investigación científicas, no se realizaron experimentos empleando muestras biológicas ni humanas ni animales.

3.1.2 Herramientas bioinformáticas y criterios de análisis estadístico:

En primera instancia se realizó un metaanálisis con el software Review Manager (RevMan), herramienta especializada para la selección de información en revisiones sistemáticas, en este caso, nos ayudará en la selección de la data de las publicaciones revisadas (Cochrane Collaboration, 2020). Una vez seleccionada la información, se empleó el entorno de software libre R Studio para determinar los miARNs consenso entre los estudios (Rstudio Team, 2020).

Para el análisis funcional de los miARNs encontrados se empleó la herramienta informática GeneCodis4 (<https://genecodis.genyo.es/>), la cual permite la integración de diferentes fuentes de información como la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) y el proyecto Ontología Genética (GO) (García-Moreno, 2021). Los genes diana de los miARNs encontrados se corroboran con aquellos obtenidos de la revisión bibliográfica y con ello tener un mayor soporte empírico.

Respecto al diseño de sets de cebadores LAMP (FIP, BIP, F3 y B3), se seleccionaron aquellos miARNs que hayan sido validados, que cumplan con los requerimientos detallados en la sección de metodología, así como la información que tengan de su presencia a nivel extracelular, sobre todo aquellos que se secretan a nivel del estroma y puedan ser encontrados en fluidos cervicales, su diseño se basó en los parámetros establecidos por Li *et al.* (2011). Con el software OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) se exploraron las características físicas de las secuencias de miARNs seleccionados y se obtuvieron las secuencias reversas complementarias.

De forma paralela, con la finalidad de tener una herramienta que brinde información de carácter cualitativo sobre la expresión de los miARNs, se diseñaron cebadores para RT-qPCR con el software libre basado en el lenguaje de programación Ruby: miPrimer (Busk, 2014).

3.2 Metodología

3.2.1 Diseño experimental

3.2.1.1 Selección de estudios para la revisión sistemática

Se realizó una amplia búsqueda de bibliografía de forma manual en diversos repositorios virtuales de acceso público por un periodo de seis (6) meses comprendidos entre los meses de junio a diciembre del año 2020.

Entre la terminología empleada para la recolección de información se encontraban palabras y frases claves como “endometrio”, “fertilidad”, “implantación”, “Técnicas de reproducción asistida”, “microARN-miRs-miARNs”, entre otros, de ello se procedió a seleccionar la data según los siguientes aspectos (Tabla 1):

Criterios de elegibilidad:

- Data transcriptómica obtenida mediante *microarrays*, *RNA-Seq*, secuenciación o detección por PCR con perfiles de expresión estadísticamente significantes y que presente evidencia de validación de forma empírica.
- Adecuado monitoreo e identificación de las fases del ciclo endometrial delimitadas en el estudio y con relación al periodo de la receptividad del tejido.
- Las mujeres participantes del estudio se encuentran en edad fértil (18-40 años) y que manifiesten un fenotipo saludable (adecuado IMC, sin evidencias de problemas de infertilidad)

La estandarización de estos criterios de selección fue guiada por el uso del método PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis Protocols*), el cual ayuda a establecer pautas uniformes para la inclusión de la data revisada mediante el uso de directrices preestablecidas (Mother *et al.*, 2009).

Por otro lado, basados en las consideraciones propias del proceso de selección previamente descrito, se delimitó la siguiente población de estudio:

- **Receptivo:** los perfiles de expresión de miARNs a nivel endometrial de mujeres sanas durante la fase secretoria del ciclo menstrual, los cuales fueron extraídos de las publicaciones elegidas para ser procesados a nivel bioinformático.
- **No Receptivo:** los perfiles de expresión de miARNs a nivel endometrial de mujeres que no se encuentran en la fase receptiva, presentan problemas de fertilidad, entre otros factores, que según el estudio comprometan su receptividad.

Tabla 1. Criterios de selección bibliográfica.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Mujeres en edad fértil e Índice de Masa Corporal (IMC) en el rango normal	Características de las participantes no detalladas: edad, IMC, estado fisiopatológico, duración del ciclo menstrual, dataje del endometrio, etc.
Individuos con ciclos menstruales regulares	No son estudios empíricamente validados.
Monitoreo del ciclo menstrual en base a la hormona luteinizante (LH)	Los resultados no son públicos
Resultados de los perfiles de miARNs publicados	No detalla el tratamiento de sus datos ni su significancia a través de parámetros estadísticos como FC o <i>P value</i> .

3.2.1.2 Estimación de la heterogeneidad de los estudios seleccionados

Con la finalidad de evidenciar el impacto de los sesgos posibles se realizó una inspección visual del diagrama de efectos o diagrama de bosque efectuados para los factores de riesgo “Edad Materna” e “Índice de Masa Corporal”, de la misma manera se examinó el diagrama de embudo o *funnel plot* también ejecutado en el software RevMan 5.4.1.

Se evaluó el estadístico I^2 como descriptor del porcentaje de variabilidad entre los estudios seleccionados y el estadístico Chi^2 de Pearson, para el cual se consideró la hipótesis nula (H_0): todos los estudios presentan una población similar “homogénea”, en caso es rechazada se concluiría que hay heterogeneidad entre ellos.

Además, se consideró estadísticamente significativo a los valores de P value menores a 0.05

3.2.1.3 Análisis bioinformático

a) Obtención de la data

En primer lugar, se colectaron los resultados de los perfiles de expresión de miARNs publicados por cada artículo, se elaboró un set de datos con esa información y se clasificaron según el nivel de expresión de los miARNs en *up-regulated* (sobre expresión) o *down-regulated* (infra expresión) basados en los parámetros de detección dictaminados por cada estudio (Tabla 8).

b) Expresión diferencial de miARNs

En cada uno de los artículos incluidos se buscó determinar miARNs expresados de forma diferencial entre las fases del ciclo endometrial, así como frente a fenotipos no receptivos como en casos de infertilidad por lo que se llevó a cabo un análisis comparativo cualitativo entre los resultados obtenidos en base a la discriminación condicional de los elementos repetidos entre los estudios y entre el tipo de biopsia empleado en cada uno de ellos.

Posteriormente se graficaron estas diferencias en el entorno de software libre R Studio sobre el set de datos creado empleando los paquetes “ggVennDiagram”, “grid”, “futile.logger” diferenciando categóricamente entre los tipos de biopsias y el nivel de expresión.

c) Análisis funcional

Para realizar el análisis funcional se emplearon herramientas del software GeneCodis4 como Gene Ontology (GO), Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) y Panther cuyos resultados nos brindan información sobre los procesos y funciones biológicas asociadas a los genes diana de los miARNs, así como su posible localización en los componentes celulares.

d) Diseño de cebadores

El diseño de cebadores LAMP para el patrón de miARNs obtenido se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Li *et al.* (2011), quienes dan información referencial sobre un *template* para miARNs validado de forma empírica, estos sets de cebadores comprendieron a los *primers* FIP, BIP, F3 y B3.

Paralelamente, se diseñaron *primers* para PCR RT para los miARNs seleccionados, debido a que se desea una estimación de la expresión de estas moléculas, sobre todo a modo de validación con relación al método anterior. La evaluación de estos cebadores fue sujeta a los softwares MFEprimer 3.1 y Oligoanalyzer.

La selección de los sets más adecuados consideraba algunos criterios de elegibilidad como el largo de los *primers*, la temperatura de hibridación, las distancias entre *primers*, un GC% entre 40-60%, etc. Asimismo, se consideró la evaluación de la formación de estructuras secundarias para todos los sets de *primers* con el software OligoAnalyzer con la finalidad de evitar dímeros entre ellos.

IV. RESULTADOS

4.1 Selección de los estudios para la revisión sistemática

Hasta la fecha, en los repositorios virtuales de libre acceso como Pubmed, Scopus y Google Scholar hay más de 300 estudios relacionados a la receptividad endometrial humana y/o a la expresión genética de miARNs de este tejido bajo diferentes enfoques.

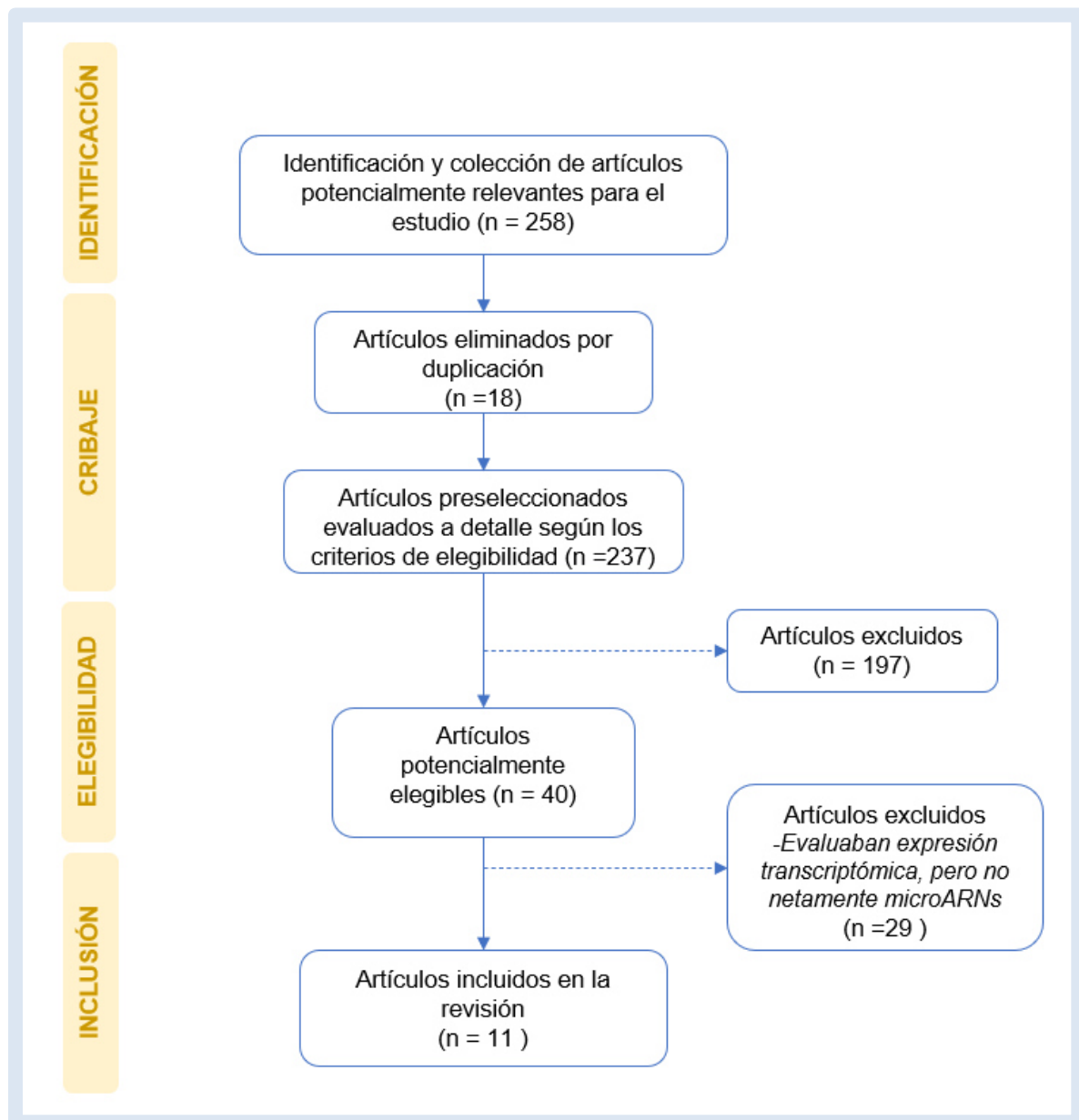


Figura 10. Flujograma para las fases de selección de la información. Desarrollado según el método "PRISMA" basado en los criterios señalados por Moher *et al.*, 2009.

Los artículos fueron filtrados según los criterios de elegibilidad (Tabla 1) e inclusión detallados en el flujograma (Figura 10), sin embargo, uno de los principales factores limitantes para su selección fue la disponibilidad de información de acceso público. Finalmente, se obtuvo un total de once (11) publicaciones adecuadas según los criterios establecidos, cuya información más detallada se encuentra en la Tabla 2.

4.2 Estimación de la heterogeneidad de los estudios seleccionados

Cabe resaltar que se realizó una estimación de la heterogeneidad entre estos estudios empleando el software Revman v5.4.1 para revisiones sistemáticas diseñado por “The Cochrane Collaboration” (2014), con la finalidad de evaluar posibles sesgos, principalmente de aquellos factores que influyen la tasa de éxito reproductivo, como la edad materna y el índice de masa corporal (Wang *et al.*, 2008; Góngora *et al.*, 2016).

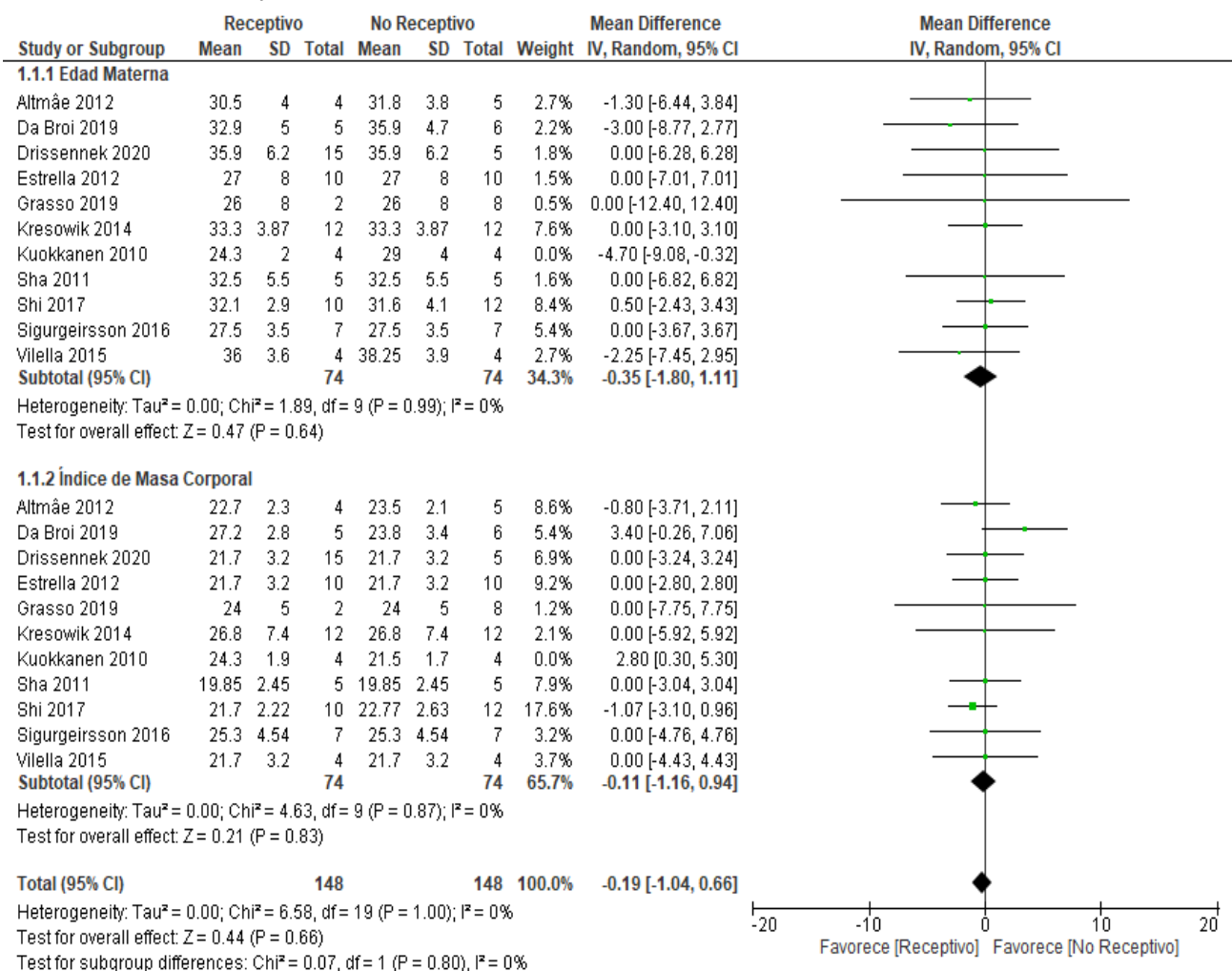
La implicancia de estos factores se puede apreciar a diferentes niveles: en la calidad gamética, la función ovárica y cambios en la morfología endometrial que pueden repercutir en la receptividad del endometrio *per se* y por ende con su estimación (Wallach *et al.*, 1994; Armstrong, 2001; Elnashar *et al.*, 2004).

Con relación a la edad materna, Wang *et al.* (2008) sugieren 35 años como umbral por defecto de la edad reproductiva, por ello se busca que entre los estudios seleccionados no existan diferencias significativas entre las edades de los individuos. Análogamente, Góngora *et al.* (2016) muestran la influencia del índice de masa corporal (IMC) y su relación negativa en la fertilidad. El valor de IMC considerado normal y saludable se encuentra en un rango de 18.5 a 25, por lo que valores fuera de este rango son considerados cuadros de sobrepeso o infrapeso, condiciones que pueden derivar a alteraciones fisiopatológicas de la función ovárica, calidad gamética, así como desórdenes hormonales que repercutirían en la morfología endometrial (Bellever, 2013).

En consecuencia, las mujeres que aquejan estos problemas manifestarían una baja tasa reproductiva (Bellever, 2007). Sin embargo, este factor afectaría de forma similar al factor masculino, sobre todo en la calidad espermática (Cubas, 2018).

Por ello, en primer lugar, se evaluó el impacto de estos factores de riesgo en los estudios seleccionados mediante diagramas de efectos y un subsecuente análisis de parámetros estadísticos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2. Los resultados obtenidos mediante los estimadores de dispersión χ^2 de Pearson es mayor a 0.05 y el porcentaje de heterogeneidad I^2 es igual a cero, por lo que no muestran diferencia significativa entre las personas involucradas entre los estudios, hecho que se remarca en la distribución de estos en el diagrama de efectos.

Tabla 2. Análisis de la heterogeneidad y diagrama de efectos para los factores "Edad materna" e "índice de Masa Corporal" de los estudios seleccionados. Realizado con el software RevMan v5.4.1



No obstante, al realizar la inspección visual del gráfico de embudo para estos criterios de inclusión se muestra que el estudio llevado a cabo por Kuokkanen *et al.* (2010) se encuentra fuera del intervalo de confianza, por lo que se decidió retirarlo del análisis. Los gráficos de embudo efectuados con su simetría muestran la escasa heterogeneidad entre los estudios, así como que estos estudios recuperados puedan brindarnos información estadísticamente robusta debido a que se encuentran principalmente en la zona superior correspondiente a un menor error estándar y con ello una mayor precisión (Figura 11). Cabe resaltar que estos diagramas se elaboraron con la finalidad de valorar el sesgo de publicación de los estudios encontrados a la fecha previo a efectuar el análisis, mas los espacios vacíos denotarían un espectro de estudios no incluidos, probablemente porque no cumplieron con los criterios de elegibilidad establecidos.

Con todo ello presente, finalmente los diez (10) estudios restantes fueron incluidos en la revisión sistemática (Tabla 3).

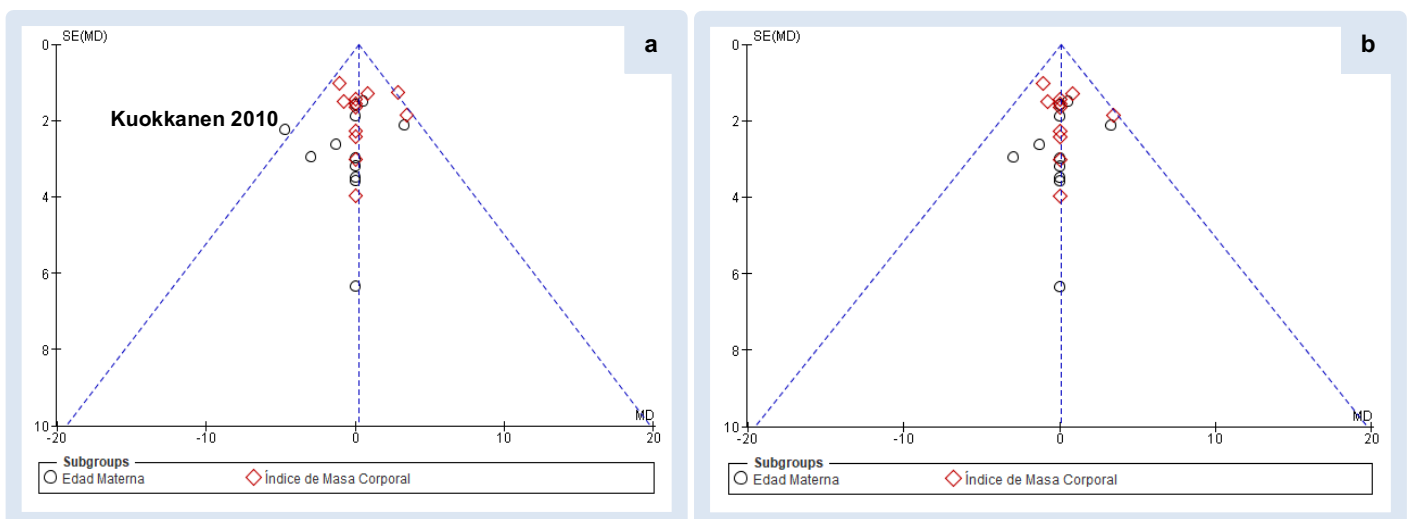


Figura 11. Diagrama de embudo para la evaluación del sesgo de publicación graficados con el software RevMan v5.4.1. Muestra la medida de efectos en base al error estandarizado a) Todos los artículos preseleccionados b) Artículos finalmente incluidos en el estudio.

Tabla 3. Estudios incluidos según el protocolo de selección bibliográfica “PRISMA” y evaluación estadística subsecuente.

Estudio	Participantes	Región	Tamaño muestral	Rango de edades	Monitoreo del ciclo menstrual	Fase del ciclo	Metodología		Análisis estadístico	
							Obtención de la muestra	Procesamiento	FC	Pvalue
Altmäe <i>et al.</i> (2012)	Mujeres fértiles vs infértiles	Europa	n=9	30.5±4	LH orina	LH+2-7	Biopsia con cánula pipelle	Microarray	>2	<0.05
Da Broi <i>et al.</i> (2019)	Mujeres fértiles vs infértiles	América del Sur	n=12	32.9±3	Criterios histológicos de Noyes	LH+6-8	Biopsia con cánula pipelle	RNA-seq	>1	<0.05
Drissenek <i>et al.</i> (2020)	Mujeres fértiles vs infértiles	Europa	n=20	35.9±6.2	Win-Test	LH+7	Biopsia endometrial	Microrarray TaqMan miRNA assay	>2	<0.05
Estrella <i>et al.</i> (2012)	Mujeres sanas fértiles	Europa	n=20	27±8	LH orina	LH+6-8	Biopsia endometrial y cultivo	miRNA PCR Array	>1	<0.05
Grasso <i>et al.</i> (2019)	Mujeres sanas fértiles	Europa	n=10	26±8	LH orina	LH+3-7	Aspiración con cánula wallace	NGS	>2	<0.05
Kresowik <i>et al.</i> (2014)	Mujeres fértiles	América	n=12	33.3±3.87	Nivel de progesterona	LH+6-8	Biopsia con cánula pipelle	RT-PCR	>1	<0.05
Sha <i>et al.</i> (2011)	Mujeres con un endometrio sano vs RIF	Asia	n=22	32.1±2.9	LH orina	LH+5-7	Biopsia endometrial	Microarray	>2	<0.05
Shi <i>et al.</i> (2017)	Mujeres sanas	Asia	n=10	32.5±5.5	LH orina	LH+2-7	Biopsia endometrial	Deep Sequencing	>2	<0.05
Sigurgeirsson <i>et al.</i> (2016)	Mujeres sanas	Europa	n=7	27.5±3.5	LH orina	LH+7-9	Biopsia endometrial	True-seq	>2	<0.01
Vilella <i>et al.</i> 2015	Mujeres fértiles	Europa	n=4	37.5±4.2	Fechas menstruales	LH+2-7	Aspiración con cánula wallace	Microarray	>2	<0.05

4.3. Análisis de la data recolectada

a) Evaluación comparativa entre los miARNs diferencialmente expresados que fueron reportados

Una vez culminado el proceso de selección de los artículos, se extrajeron los resultados respecto a los miARNs diferencialmente expresados para el periodo de receptividad endometrial, con los cuales se construyó una matriz con *Microsoft Excel* que fue sometida a un análisis comparativo.

Durante este proceso se clasificó la data entre estudios según el tipo de biopsia sobre el cual habían realizado su evaluación, la plataforma empleada y el nivel de expresión del miARN reportado en la categoría *upstream* o *downstream* (Tabla 8).

Con la finalidad de determinar la existencia de asociación entre los miARNs diferencialmente expresados para el fenotipo receptivo, se evaluó la presencia-ausencia de estos miARNs entre los estudios para calcular el coeficiente de correlación en la propia matriz. Debido a que ningún miARN reincidía en al menos el 50% de los estudios, los resultados negativos (valor= -1, Figura 20) mostraban de forma preliminar que no se evidenciaría algún tipo de relación entre estos miARNs y el estado de receptividad endometrial.

Sin embargo, se observó que hubo cierta congruencia en los resultados obtenidos de forma independiente, por ejemplo, los estudios llevados a cabo por Altmâe (2012), Kresowik (2014) y Sha (2011) coinciden en la sobreexpresión de los miR-30b y miR-30d, pertenecientes a la familia miR-30 con funciones relevantes para el desarrollo discutidas más adelante.

Estas diferencias pueden deberse a la elección del método de detención de los miARNs propio de cada estudio según su diseño experimental, lo cual es de especial interés ya que los límites de detención varían según la plataforma utilizada.

Cabe resaltar que durante la revisión bibliográfica las plataformas Agilent, Affymetrix y NGS de Illumina fueron las más comunes; sin embargo, según Leshkowitz *et al.* (2013) entre ellas

existen diferencias que les dan cierta ventaja a las plataformas Agilent y a Illumina que por su diseño muestran una alta sensibilidad, discriminación y desempeño en la detección de moléculas tan pequeñas como los miARNs. Por otro lado, el hecho de que haya congruencias de resultados independientemente de las plataformas de detección que se hayan decidido utilizar y la diversidad de las poblaciones de estudio sugiere la presencia de estas moléculas durante el periodo receptivo.

Respecto al tipo de biopsia empleada, como se ha mencionado anteriormente, en estos estudios se emplearon biopsias sólidas correspondientes al tejido endometrial y líquidas provenientes del fluido endometrial. Agrupamos los resultados según el tipo de biopsia y realizamos otro análisis comparativo de carácter cualitativo cuyos resultados se pueden visualizar en el diagrama de Venn-Euler mostrado a continuación (Figura 12).

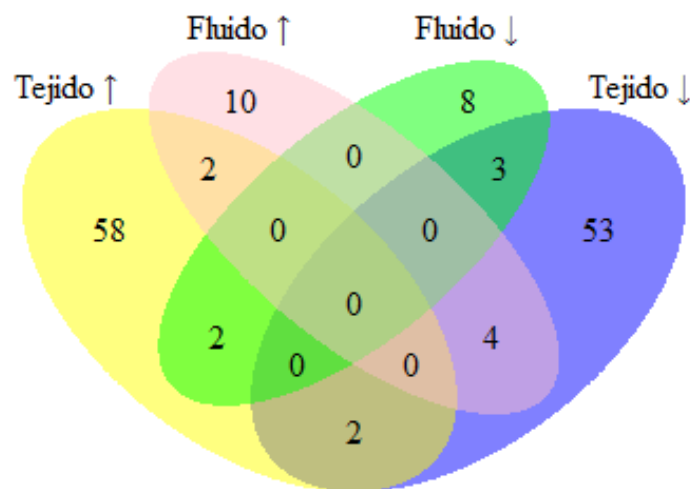


Figura 12. Diagrama de Venn-Euler graficado con RStudio. Representa el número de miARNs reportados según el tipo de biopsia y el nivel de expresión.

Los resultados de esta comparativa mostraron tanto miARNs propios de cada biopsia, algunos en común y otros conflictivos que se consideraron resultados controversiales y corresponden al 5.9% de los miARNs reportados; además, es preciso señalar que este último grupo de resultados fue valorado de esa forma debido a que en algunos casos los miARNs reportados se sobreexpresaban en un tipo de biopsia y presentaban una baja expresión en

la otra, e inclusive en algunos casos podían estar sobreexpresados y no en otros para el mismo tipo de biopsia.

Por otro lado, curiosamente hubo un consenso entre miARNs diferencialmente expresados reportados para ambas biopsias, en este caso 2 miARNs se sobreexpresaron tanto para muestras de tejido endometrial como para fluidos y 3 miARNs evidenciaron una baja expresión para ambas biopsias, esta información se agrupó en la Tabla 4 a modo de resumen. Este consenso entre miARNs reafirmaría su expresión a nivel endometrial sugiriendo su posible uso como biomarcador, por lo cual se decidió emplearlos para el análisis posterior.

Tabla 4. Matriz con los miARNs diferencialmente expresados exclusivamente en biopsias de fluido endometrial.

Tipo de biopsia: Fluido endometrial	
Nivel de expresión	miARNs
↑	hsa-miR-141-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-873-3p, hsa-miR-30d-3p, hsa-miR-450a, hsa-miR-320a, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-509-3-5p
↓	hsa-miR-29b, hsa-miR-210, hsa-miR-148a, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-873

Tabla 5. Matriz con los miARNs diferencialmente expresados tanto en biopsias de tejido endometrial como en aspiraciones de fluido

Nivel de expresión	DEGs consenso	Tipo de biopsia	
		Tejido	Fluido
↑	<i>hsa-miR-345-5p</i>	✓	✓
	<i>hsa-miR-199b-5p</i>	✓	✓
↓	<i>hsa-miR-200c</i>	✓	✓
	<i>hsa-miR-30a</i>	✓	✓
	hsa-miR-141	✓	*

b) Análisis funcional de los miARNs seleccionados

Debido a que muchos reportan solo el miARN precursor, pero no el maduro se realizó una inspección a nuestra Tabla 5, de la cual notamos que Grasso *et al.* (2019) reportaron al miARN maduro miR-141-3p como sobreexpresado en la muestra de fluido endometrial, mientras que varios otros estudios reportan a su precursor como recurrente en el grupo de baja expresión para biopsias de tejido endometrial, por la información controversial al respecto se decidió excluir esta molécula del estudio.

Para el análisis funcional empleamos miRDB, una base de datos online que permite la predicción de los genes *diana* de cada miARN (Tabla 9), así como su anotación funcional (Chen & Wang, 2020). Además de GeneCodis4, una herramienta online para la integración del análisis funcional, con la cual nos enfocamos en el proceso biológico y la ubicación subcelular a través de Ontología Genética (GO), así como las vías metabólicas relacionadas mediante Panther (García-Moreno, 2021).

Las gráficas de barras obtenidas que se muestran en las Figuras 13-16, nos señalan el número de genes con el que interaccionan estos miARNs y las funciones biológicas asociadas, en este caso, los miARNs seleccionados se encuentran más relacionados a la regulación de la transcripción, apoptosis, migración y diferenciación celular. En la Figura 15 nos señalan que esos elementos interactúan principalmente en la transducción de señales, la transcripción genética y la inmunomodulación. Entre los eventos relacionados a sus funciones, muestran que podrían tener un rol importante en la angiogénesis, las vías de señalización de las integrinas y en los procesos de inflamación. Asimismo, los miARNs seleccionados tendrían preferencia a coordinar estas funciones dentro del ambiente celular, lo cual puede reforzar la idea de su transporte mediante exosomas e integración hacia los diferentes tipos celulares.

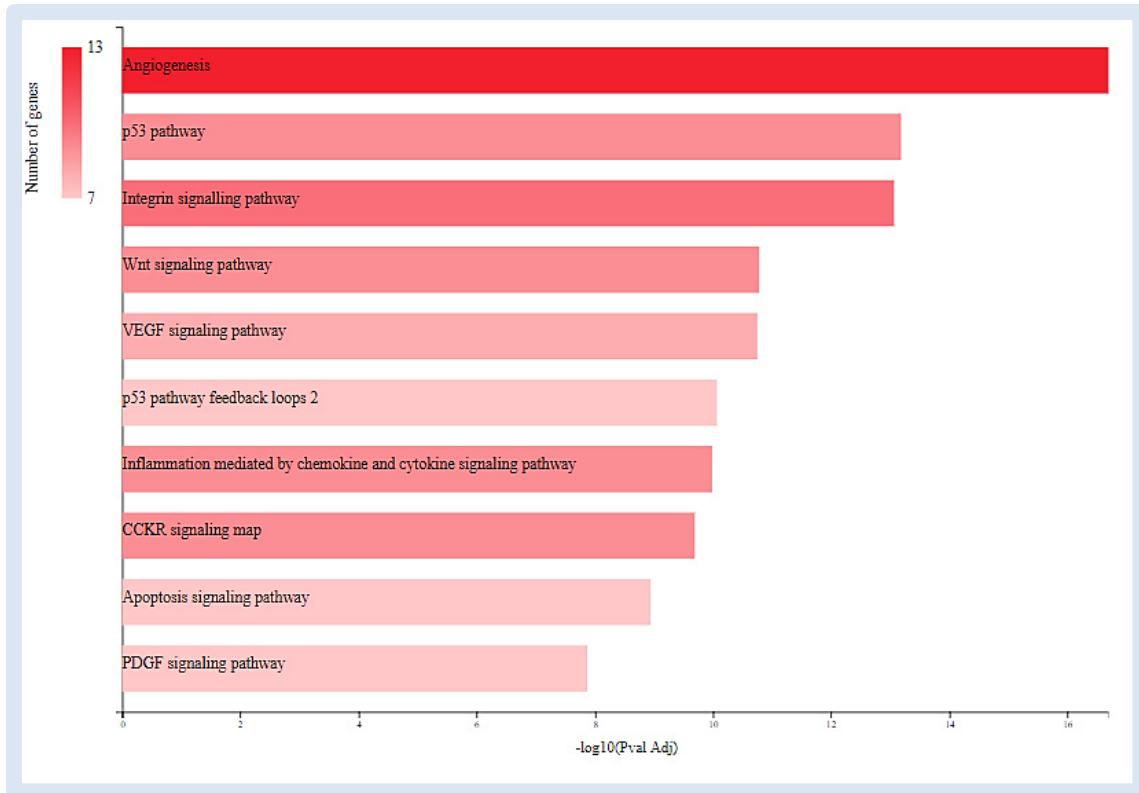


Figura 13. Gráficas de barras correspondientes al análisis funcional llevado a cabo en GeneCodis4-GO. para evidenciar los procesos biológicos relacionados a los miARNs.

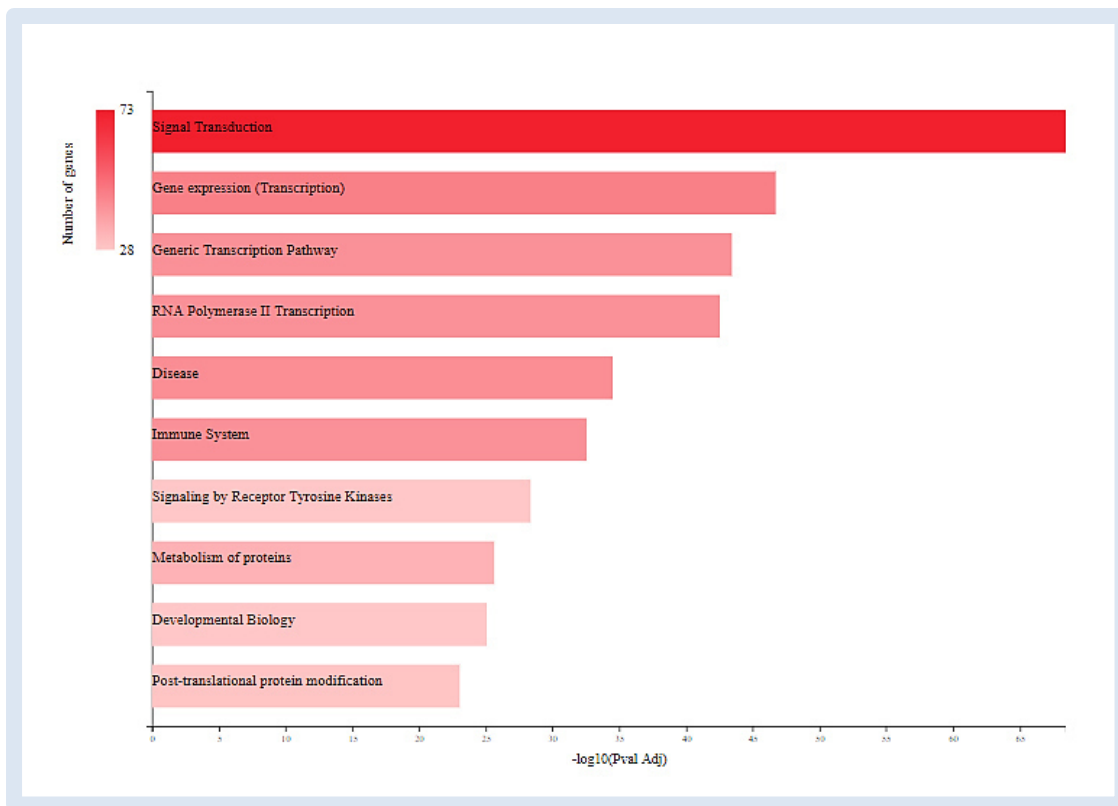


Figura 14. Gráficas de barras correspondientes al análisis funcional llevado a cabo en GeneCodis-Reactome, se muestran los procesos celulares más representativos relacionados a los miARNs.

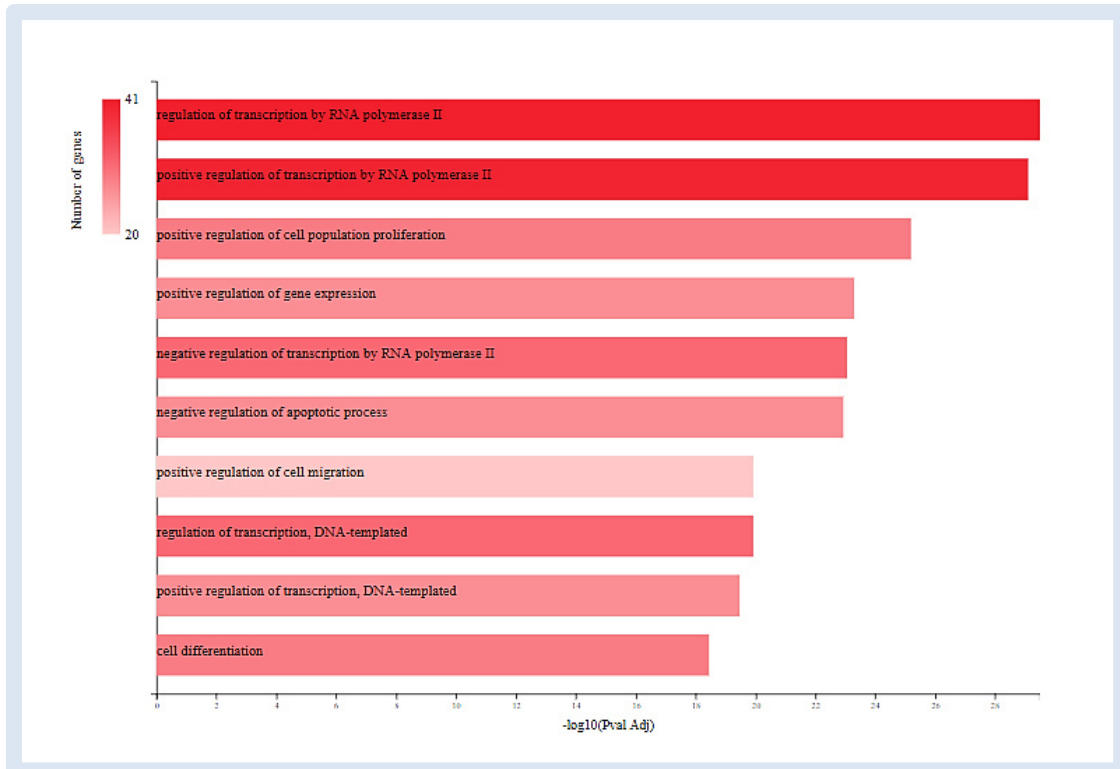


Figura 15. Gráficas de barras correspondientes al análisis funcional llevado a cabo en GeneCodis4 y Panther en relación con las vías metabólicas asociadas.

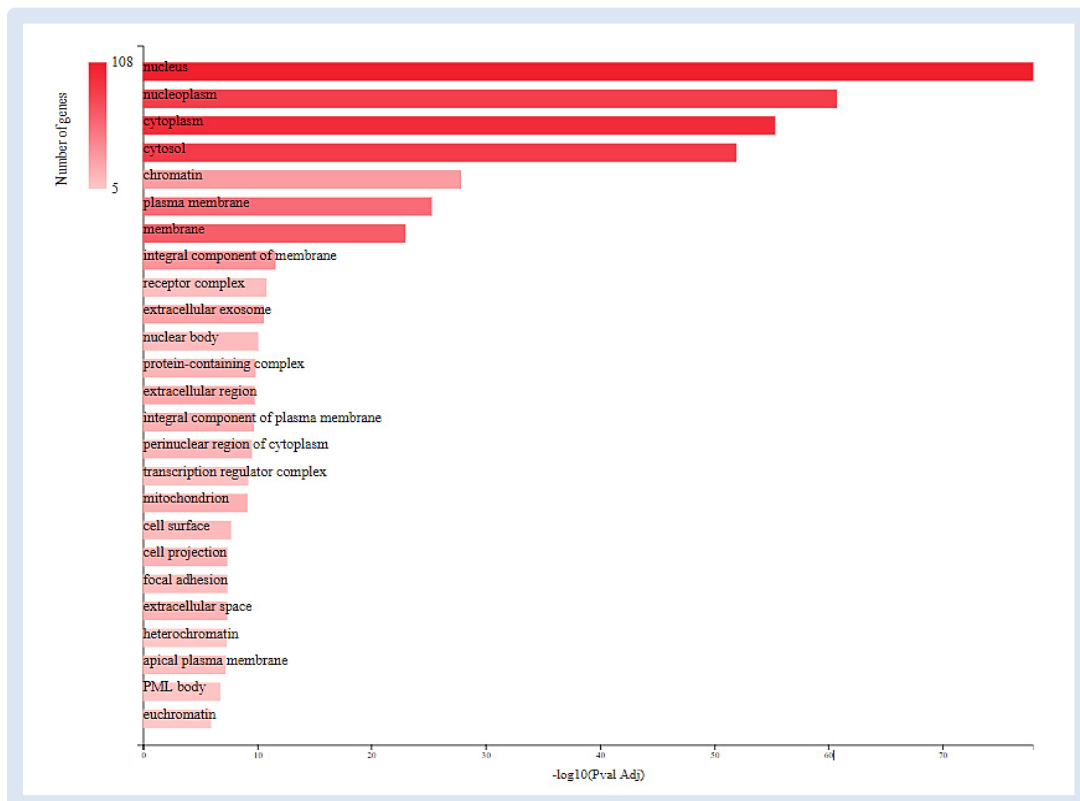


Figura 16. Gráficas de barras correspondientes al análisis funcional llevado a cabo en GeneCodis4 y GO que muestran las localizaciones subcelulares más frecuentes de estos miARNs.

c) Diseño de cebadores

En primera instancia se diseñaron los cebadores para RT-qPCR en el software miRPrimer (Busk,2014), con el cual obtuvimos los siguientes resultados detallados en la Tabla 6 para los miARNs miR-199b-5p y miR-345-5p, correspondientes a las secuencias maduras sobreexpresadas.

Tabla 6. Cebadores diseñados con miRPrimer seleccionados en base a su *score*.

miARN	Secuencia (5' a 3')	Longitud (nt)
hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	23
RT Primer <i>forward</i>	GCCCAGTGTTTAGACTATCTG	20
RT Primer <i>reverse</i>	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGAACAGA	27
hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	22
RT Primer <i>forward</i>	GGCTGACTCCTAGTCCAG	17
RT Primer <i>reverse</i>	GTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGCCCTG	24

De forma alternativa se realizó el diseño de *primers stem-loop* para RT-qPCR en la plataforma online miRNA Primer Design Tool (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/>) con los cuales se obtuvieron los resultados detallados en las Figuras 17-18. Se trata de una herramienta bastante completa para una técnica relativamente reciente que sobrelleva los problemas asociados al tamaño de esta secuencia diana. Brinda información sobre el porcentaje de CG, su temperatura de *melting* (hibridación) y la longitud de cada *primer* (Czimmerer *et al.*, 2013).

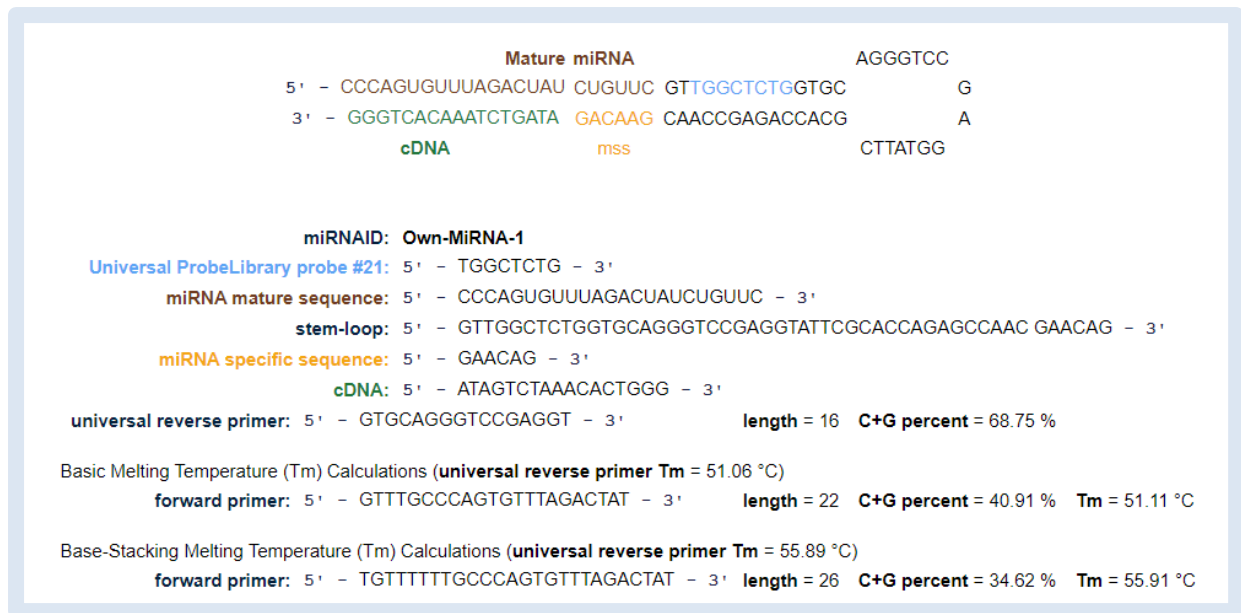


Figura 17. Cebadores *stem-loop* para miR-199b-5p

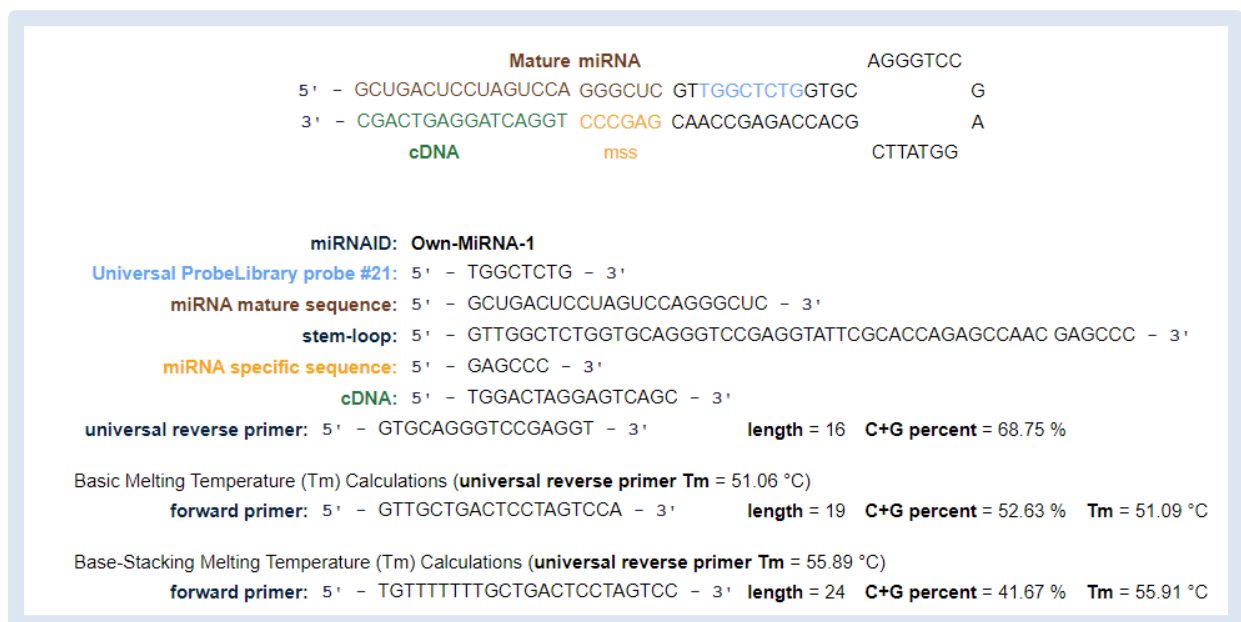


Figura 18. Cebadores *stem-loop* para miR-345b-5p

Las herramientas para el diseño propio de cebadores LAMP para estas pequeñas moléculas también son limitadas, aún con ello, Li *et al.* (2011) desarrollaron *templates* de uso libre con la finalidad de tener un molde estimado “universal” para la detección de miARNs mediante amplificación isotérmica mediada por horquillas, tal y como se observa en la Figura 19 correspondiente al extracto de su sesión experimental publicada como data suplementaria.

Let-7a miRNA: 5'-ugagguaguagguuguauaguu-3'

Primer FIP: 5'-ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCT-TTTT-GTGCGGGCCTCTTCGCTATT
AC-3'

Primer BIP: 5'-CGACTCTAGAGGATCCCCGGGTAC-TTTT-TGTTGTGTGGAATTGTGAGCG
GAT-3'

Primer B3: 5'-ACTTTATGCTTCCGGCTCGTA-3'

Template DNA (198 nt): 5'-ACTTTATGCTTCCGGCTCGTA-TGTTGTGTGGAATTGTGAGC
GGATAACAATTTACACAGGAAACGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGC
ATGCAAGCTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGGTA
ATAGCGAAGAGGCCCGCAC-AACTATACAACCTACTACTCA-3'
F2c M

Figura 19. Cebadores empleados como *templates* para la amplificación isotérmica de miARNs (Fuente: Li *et al.*, 2011)

Siguiendo sus lineamientos, reemplazamos la secuencia diana por el miARN de interés y obtuvimos las secuencias mostradas a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Cebadores diseñados según el modelo brindado por Li *et al.* (2011).

miARN	Secuencia (5' a 3')
hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC
<i>Template modificado</i>	ACTTTATGCTTCCGGCTCGTA- TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACGTA CCCAGGGATCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTACAAC GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA <u>ACTTAATCGGTAATAG</u> CGAAGAGGCCCGCAC CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC
hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC
<i>Template modificado</i>	ACTTTATGCTTCCGGCTCGTA- TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACGTA CCCAGGGATCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTACAAC GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA <u>ACTTAATCGGTAATAG</u> CGAAGAGGCCCGCAC GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC

Cabe resaltar que en sus ensayos muestran un adecuado funcionamiento de su modelo solo al cambiar la secuencia de interés por otro miARN, pero aún con ello, este procedimiento requiere validación empírica actualizada y evaluación de su efectividad como herramienta diagnóstica.

V. DISCUSIÓN

La infertilidad es una condición fisiopatológica bastante compleja y que afecta dimensiones tanto físicas como psicológicas y sociales, no obstante, muchas veces no es tratada como un problema de salud pública (Roa-Meggo, 2012). De hecho, los reportes de Sun *et al.* (2019) muestran que este problema actualmente aqueja a millones de personas y manifiesta una tendencia a aumentar con los años.

Se han hecho numerosos esfuerzos en el campo de la Medicina Reproductiva para poder hacer frente a este problema, y con lo que respecta a la infertilidad femenina, aún queda mucho por comprender para poder prevenirla y tratarla. De hecho, uno de los principales aspectos por mejorar son las tasas de éxito de los tratamientos actuales, para lo cual se tiene como primer paso lograr un evento clave para establecer un embarazo: la implantación embrionaria (Koot *et al.*, 2012).

La literatura señala que la implantación es un complejo proceso biológico que requiere de la comunicación sincrónica con el endometrio, hecho que ocurre durante un breve periodo denominado “ventana de implantación”, en el que este tejido manifiesta un fenotipo receptivo. Este periodo de tiempo es complicado de estimar ya que es variable entre cada mujer y puede tener una duración entre 12 horas y 2 días. Sin embargo, se busca una forma objetiva de poder identificarlo mediante el uso de marcadores.

Anteriormente estos marcadores se basaban en los Criterios de Noyes, establecido como el *gold estándar* para el dataje endometrial basado en criterios histológicos, estos, junto a otros marcadores de la misma categoría como la presencia de pinópodos o el grosor del endometrio, mostraban resultados controversiales que cuestionan su posicionamiento como criterio para datar el estado receptivo del endometrio (Coutafaris *et al.*, 2004; Quinn & Casper, 2009).

Hoy en día hay numerosos marcadores moleculares con los cuales se intenta brindar mayor precisión a la estimación del estado en el que se encuentra el endometrio, estos marcadores pueden ser bioquímicos como las proteínas prolactina secretada durante la decidualización y expresión de proteínas adhesivas durante el estado receptivo, o genéticos como diferencias en la expresión de ciertos genes empleados en la elaboración de pruebas transcriptómicas, ejemplo de ello es la ERA (Kabir *et al.*, 2008; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011).

Entre los marcadores genéticos, los miARNs destacan por ser moléculas pequeñas con funciones de regulación genética, que no solo se encuentran intracelularmente, sino también conformando parte del microambiente uterino, más específicamente en el secretoma.

El secretoma cervical actualmente es objeto de estudios debido al amplio espectro de moléculas que alberga, estas van desde elementos genéticos como los miARNs, biomoléculas como proteínas, lípidos y glúcidos, hasta bacterias simbiotas y células del sistema inmune que le aportan más dinamismo este ambiente (Salamonsen *et al.*, 2016). Es más, el microambiente también cambiaría en sintonía con el endometrio, Salamonsen *et al.* (2013) muestran diferencias entre los perfiles proteómicos con relación a la fase endometrial en la que se encuentra, y de forma similar, a nivel transcriptómica también se han evidenciado diferencias tanto en la expresión genética como en los perfiles de miARNs, en congruencia con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

De todos los estudios revisados aún son muy pocos los cuales se enfocan netamente en el fluido endometrial también conocido como moco cervical o flujo uterino. Esto es un aspecto bastante curioso ya que presenta grandes ventajas de importancia clínica respecto a otros tipos de muestras: se trata de una biopsia líquida rápida obtención y menor incomodidad, que además tiene el potencial de brindar información relevante si es que en su entorno se tuviera un marcador establecido para la situación de interés, que podría ser el dataje endometrial o inclusive cuadros patológicos que le dan la dimensión diagnóstica al estudio de esta biopsia.

Respecto a la data empleada, en general, se trató de grupos poblacionales que no eran muy heterogéneos, lo cual se debe principalmente a los criterios de elegibilidad empleados para poder filtrar información de forma objetiva. Cabe mencionar que al momento de valorar estadísticamente estas diferencias entre poblaciones en base a factores de riesgo para la fertilidad femenina como la edad materna y el IMC se tuvo que retirar un estudio correspondiente a Kuokkanen *et al.* (2010) que si bien se encontraba alrededor del rango establecido para la edad, el peso que aportaba por tener un mayor número de participantes aumentaba su significancia estadística comprometiendo el porcentaje de heterogeneidad global, lo cual contrasta con el estudio llevado a cabo por Vilella *et al.* (2015) que si bien las edades se encontraban en el límite superior de lo establecido, solo contaba con 4 participantes que no comprometían significativamente a la dispersión de edades de la población total.

Con relación a los miARNs diferencialmente expresados, se contrastaron entre estudios y según el tipo de biopsia empleando herramientas ofimáticas básicas por el hecho de tratarse de una comparación de carácter cualitativo, de ello se obtuvo en común un 3.7% de elementos: 2 miARNs sobreexpresados tanto en tejido endometrial como en el endometrio y 3 miARNs de baja expresión para ambas biopsias, y propiamente para el fluido endometrial se obtuvo 8 miARN sobreexpresados y 6 que presentaban una baja expresión. Cabe destacar que muchos resultados reportados señalen a la secuencia inmadura y no a la secuencia procesada, podría tener relación con la obtención de la biopsia y extracción de ARN, ya que según Paul *et al.* (2018) estos miARNs requieren un procesamiento que inicia en el núcleo y culmina en el citoplasma, pero en ese caso tanto Vilella como Grasso hubieran reportado exclusivamente miARNs de secuencia madura, por lo que se puede atribuir a las metodologías de detección y elaboración de la sonda.

Ambas secuencias pertenecerían al mismo grupo, lo cual puede ocasionar un conflicto de interpretación, que se sumaba al hecho de que también había elementos cuya expresión no

era congruente y en algunos estudios reportaban su sobreexpresión y en otros como baja, lo cual puede ser producto del dataje endometrial, para lo cual se requeriría un estudio que lo confirme de forma empírica.

El análisis de asociación empleando la función “Coeficiente de correlación” usada para la evaluación categórica en la matriz elaborada mostraba una tendencia negativa, rechazando la hipótesis de asociación entre el fenotipo receptivo y el patrón encontrado, al menos para este limitado número de estudios. Los miARNs seleccionados no se expresaban en al menos un 50% de los estudios evaluados; sin embargo, a pesar de no haberse encontrado asociación entre los miARNs encontrados y el fenotipo receptivo, la reincidencia de estos miARNs en estudios independientes sugiere la posibilidad de encontrarlos durante la ventana de receptividad, por lo que resultados obtenidos son atribuidos principalmente al limitado número de estudios incluidos, por ello se recomienda ampliar el tamaño muestral a evaluar.

La identificación de potenciales biomarcadores se basa en discriminar elementos que ayuden a una gran población a discriminar su periodo receptivo independientemente del tipo de biopsia empleada, pero si con ello se puede derivar al uso progresivo de biopsias menos invasivas, mejor, ya que su practicidad promoverá su uso rutinario a nivel clínico (Edgell *et al.*, 2013). Por esta razón, seleccionamos a los miARNs maduros consenso para ambos tipos de biopsias que no presenten ningún tipo de conflicto: miR-199b-5p y miR-345-5p. Estructuralmente, las secuencias de estos miARNs presentan una longitud de 23 y 22 nucleótidos respectivamente, tamaño concordante con las características señaladas por una revisión de estas moléculas llevada a cabo por Paul *et al.* (2018). Ambas corresponden la región 5' del precursor de su respectivo miARN, Khvorova *et al.* (2003) sugieren que dependiendo de la composición nucleotídica de la secuencia algunas de estas regiones presentan un menor perfil termodinámico que tiende a interactuar con RISC formando complejos “funcionales” con implicancias en la regulación genética. A pesar de ello, no podríamos aseverar una “dominancia” de expresión de miR-5p entre las secuencias maduras, ya que entre los resultados generales documentados de los estudios seleccionados no hubo

predominancia significativa de alguno en particular y considerando que muchos de los estudios no denotaban la secuencia madura sino el precursor. En parte esto es congruente con lo expresado por Ro *et al.* (2007) quienes señalan que ambos tipos de miARNs se co-expresan a nivel uterino.

El análisis funcional de ambos miARNs detallaba que principalmente se encontraban altamente involucrados con la ARNpol II, lo cual se relaciona con los eventos propios de su biogénesis vía canónica: el procesamiento y maduración de la secuencia, así como con sus niveles de expresión (Ha & Kim, 2014).

La familia MIR345 anteriormente ha sido publicada como sobreexpresada por Sigurgeirsson *et al.* (2016) y Kuokkanen *et al.* (2010) quienes además señalan su influencia en la receptividad del endometrio, en concordancia con estos estudios también se obtuvo la relación con eventos de proliferación y muerte celular, así como la regulación de la transcripción genética y la organización celular.

Sha *et al.* (2011) también menciona que la familia MIR199 es de las más abundantes reportadas en las bases de datos y Grasso (2017) inclusive muestra la asociación de estos miRs con los genes planteados para la prueba ERA, un ensayo que emplea la firma transcriptómica del endometrio para determinar la receptividad y sugiere su posible uso como biomarcador. Ahora bien, la base de datos HGEx que contiene información sobre los genes involucrados en la receptividad endometrial (<http://resource.ibab.ac.in/HGEx-ERdb/>) aún no los incluyen en su lista, como si algunos de los genes obtenidos en la plataforma GeneCodis4; THBS1 y CCN1 para miR-199, lo cual sugiere su influencia en la angiogénesis y contracción muscular del endometrio, claves en su fisiología (Tabla 9).

La familia MIR199 también podría tener un rol en la implantación y progresión embrionaria, Xia *et al.* (2013) documentaron su expresión diferencial en ratas entre las fases pre receptiva y receptiva, y señala que su alta expresión se puede deber al proceso de decidualización endometrial.

Una vez identificados ambos miARNs se procedió a la búsqueda de una forma costo efectiva de poder detectarlos, sobre todo pensando en un uso clínico. En primera instancia, las reacciones de amplificación isotérmica son un ensayo plausible para ello ya que eliminaría la necesidad de costosos equipos como los termocicladores debido a que solo requiere mantener una temperatura estable para poder amplificar la secuencia, e inclusive actualmente se incorpora una molécula para el reconocimiento cualitativo de la reacción positiva, como Thi *et al.* (2020) llevan realizando para la rápida detección de ARN de SARS-CoV-2 en el marco actual de la pandemia.

Aun así, los miARNs presentan una secuencia bastante pequeña como para ser identificados de forma convencional, por lo que se recurre al uso de horquillas o *loops* para su detección. Esta técnica se llama *stem-loop* PCR de transcripción reversa ya que requiere el ADNc del miARN en su secuencia molde (Kramer, 2011). En este caso, cada grupo de *primers* contaba con un cebador *forward* específico y un cebador *reverse* universal por miARN. Los *sets* de *primers* obtenidos mostraban una temperatura de hibridación adecuada cuya diferencia era menor a 1°C entre el *forward* y el *reverse*. Además de la estructura en *stem-loop* que presentaban, contaba con una secuencia “base-stacking” (apilamiento de bases) que permite interacciones más estables que repercuten en mantener la amplificación a la misma temperatura (isotérmica) (Williams *et al.*, 2017).

Si bien se obtuvieron los cebadores para este ensayo, al presentar varios pasos y requerimiento de equipos, su uso como tal no contribuía en la reducción de costos o en mejorar la practicidad del ensayo, por lo que se buscó una forma alternativa de detectarlos: LAMP (amplificación isotérmica mediada por lazos).

Por el tamaño de la secuencia no se podían emplear herramientas bioinformáticas convencionales como Primer Explorer 5, más Li *et al.* (2011), quienes en ese momento se encontraban con el mismo problema, desarrollaron un modelo de secuencia de fácil adaptación para la amplificación isotérmica de miARNs en un solo paso, por lo que se empleó este modelo para estimar el diseño de ambos cebadores.

Los cebadores empleados para métodos de amplificación isotérmica mediada por lazos se diseñan para tener unas temperaturas de hibridación alrededor de 60-65°C semejantes a las condiciones de trabajo de la enzima, generalmente *Bst* polimerasa, y se estima un porcentaje de GC entre 40-60% (Eiken Chemical Co, 2019).

Las secuencias propias de los miR seleccionados oscilan entre 54-60% de porcentaje de CG, en contraste con la secuencia modelo empleada miR-let-7a con 40% de porcentaje de CG aproximadamente, estas diferencias pueden repercutir en la temperatura de hibridación final de *primer* elaborado, por lo que de emplearse requerirá una evaluación de las condiciones del ensayo posterior a la validación de estos cebadores.

Es importante resaltar que evaluar la especificidad de estos *primers* no es tarea sencilla, siendo su mayor limitante la longitud de la secuencia, imposibilitando el uso de herramientas comunes como Oligoanalyzer o Primer Blast, e inclusive MFEprimer 3.1 con los que se obtenía ningún resultado o uno no específico, como es el último caso, ello junto a la falta de métodos de evaluación de acceso público para estos elementos son sus principales flaquezas, por ello se remarca la necesidad de la validación experimental respectiva.

Finalmente, se espera que este trabajo también contribuya a resaltar la necesidad y relevancia de identificación de biomarcadores, así como la adaptación de diferentes técnicas de detección en la práctica clínica. Por ello, se sugiere el estudio y uso de estas técnicas de alta sensibilidad para la detección de estos miARNs como las amplificaciones isotérmicas mediadas por estructuras en forma de lazo, las cuales permiten la detección de miARNs hasta en pequeñas muestras de fluido cervical de forma costo-efectiva y menos invasiva que las biopsias de tejido endometrial convencionales.

Estas nuevas tecnologías de amplificación genética, por su naturaleza eficiente sin la necesidad de costosos equipos de laboratorio en comparación con muchas otras técnicas de diagnóstico, se vuelven cada vez más factibles para un uso rutinario a nivel clínico.

Cabe resaltar que la futura validación de los cebadores obtenidos y su estandarización apoyaría en el desarrollo de herramientas de utilidad clínica a menores costos y tiempos de respuesta, con los cuales optimizar los tratamientos de fertilidad.

VI. CONCLUSIONES

6.1 El análisis comparativo de los perfiles de expresión de miARNs durante el periodo de receptivo del endometrio soporta la hipótesis planteada, ya que muestra de forma preliminar un patrón de expresión diferencial en común entre los estudios independientes evaluados, el cual está compuesto por: miR-30, miR-200, miR-199 y miR345, estos dos últimos sobreexpresados tanto para biopsias líquidas correspondientes al secretoma endometrial como para biopsias sólidas de este tejido, lo cual sugiere la posibilidad de emplear estas secuencias como potenciales biomarcadores de la receptividad endometrial.

6.2 Si bien se encontraron miARNs diferencialmente expresados en común para el fenotipo receptivo entre los estudios incluidos en el análisis, no se evidenció una asociación significativa entre la presencia de estos miARNs y el periodo receptivo como tal, ello es principalmente atribuido al limitado número de estudios con información relevante de acceso libre, por lo que se requiere un mayor tamaño muestral y evidencia empírica en población objetivo para poder corroborar estos resultados.

6.3 El análisis funcional de los miARNs miR-345 y miR-199 muestra que su expresión diferencial tendría un rol en los cambios morfológicos que sufre el endometrio en las diferentes fases de su ciclo ya que se encuentran involucrados en eventos de proliferación y muerte celular, vitales para procesos biológicos como la decidualización endometrial.

6.4 Se diseñaron diferentes cebadores para la detección de los miARNs seleccionados mediante técnicas de amplificación de alta sensibilidad: RT-qPCR, *stem-loop* RT-qPCR y LAMP, los cuales requieren de validación experimental para evaluar su efectividad, especificidad y aplicabilidad, sobre todo en el ámbito clínico.

VII. RECOMENDACIONES

7.1 Se recomienda ampliar el tamaño muestral. Además, se sugiere un enfoque longitudinal para evidenciar cambios en los patrones de expresión a lo largo del ciclo de la población en estudio.

7.2 En primera instancia, se sugiere el uso de herramientas análisis transcriptómico como paneles de *microarrays* o secuenciación por RNA-seq, las cuales son de las más comunes entre los estudios revisados.

7.3 Repetir la búsqueda de herramientas bioinformáticas para la evaluación y diseño de cebadores *in silico*, esperando que se hayan desarrollado nuevos programas que tengan esta finalidad.

7.4 Estudiar los perfiles de expresión diferencial del ciclo endometrial en la población peruana.

7.5 Corroborar la expresión diferencial de miR-345 y miR-199 durante la ventana de receptividad.

7.6 Determinar si estos factores también tienen un patrón de expresión diferencial en otros fluidos como la orina o el plasma.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human reproduction update*, 12(6), 731-746.
- Altmäe, S., Martinez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Ruiz-Alonso, M., Stavreus-Evers, A., Horcajadas, J. A., & Salumets, A. (2013). MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reproductive sciences*, 20(3), 308-317.
- ASRM - American Society for Reproductive Medicine (2012). *Tecnologías de Reproducción Asistida. Guía para pacientes.*
- Armstrong, D. T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55(6), 1303-1322.
- Audesirk, T., Audesirk, G. & Bayers B. (2011) *Biología: La vida en la Tierra.* Pearson education México. Novena edición. Capítulo 1, pág. 11.
- Barbieri, R. L. (2019). Female infertility. In Yen and Jaffe's *Reproductive Endocrinology* (pp. 556-581). Elsevier.
- Barrios, Emilia Elena, Espinoza, Milagros, Leal, Ulises, Ruiz, Nelina, Pinto, Viana, & Jurado, Beatriz. (2011). Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación. *Salus*, 15(2), 28-34
- Bellver, J., Melo, M. A., Bosch, E., Serra, V., Remohí, J., & Pellicer, A. (2007). Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertility and sterility*, 88(2), 446-451.
- Bhusane, K., Bhutada, S., Chaudhari, U., Savardekar, L., Katkam, R., & Sachdeva, G. (2016). Secrets of endometrial receptivity: some are hidden in uterine secretome. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(3), 226-236.

- Busk, P.K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics* 15(1):29
- Cabrera, A., Kuri, M. R., Valdez, M. P. H., & García, E. L. (2020). Tasas de éxito en clínicas de fertilidad.: Notables diferencias al comparar la información que proporcionan las clínicas de fertilización asistida en México, la obtenida de los reportes internacionales y la extraída de un estudio de campo realizado en México. *Medicina y ética: Revista internacional de bioética, deontología y ética médica*, 31(2), 245-265.
- Cakmak, H., & Taylor, H. S. (2012). Assessment of Uterine Receptivity. In *Practical Manual of In Vitro Fertilization* (pp. 559-566). Springer, New York, NY.
- Carrascosa, J. P., Horcajadas, J. A., & Moreno-Moya, J. M. (2018). The Molecular Signature of the Endometrial Receptivity: Research and Clinical Application. *Reproductomics*, 279–301. doi:10.1016/b978-0-12-812571-7.00016-2
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., ... & Li, Q. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*, 18(10), 997-1006.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in cell biology*, 22(3), 125-132.
- Cheong, Y., Boomsma, C., Heijnen, C., & Macklon, N. (2013). Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. *Fertility and sterility*, 99(4), 1093-1099.
- Cubas Padrón, N. D. J. (2018). Influencias del sobrepeso en la fertilidad humana.
- Czimmerer, Z., Hulvely, J., Simandi, Z., Varallyay, E., Havelda, Z., Szabo, E., ... & Balint, B. L. (2013). A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PloS one*, 8(1), e55168.

- Da Broi, M. G., Meola, J., Praça, J. R., Peronni, K. C., Rocha Jr, C. V., Silva Jr, W. A., ... & Navarro, P. A. (2019). Is the profile of transcripts altered in the eutopic endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window?. *Human Reproduction*, 34(12), 2381-2390.
- Deng, R., Zhang, K., & Li, J. (2017). Isothermal amplification for microRNA detection: from the test tube to the cell. *Accounts of chemical research*, 50(4), 1059-1068.
- Denker, H. W. (1993). Implantation: a cell biological paradox. *Journal of Experimental Zoology*, 266(6), 541-558.
- Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A., & Thomas, P. (2014). Loop-Dumediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 17(2), 151-166.
- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J. A., Martínez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Alamá, P., Pellicer, A., & Simón, C. (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and sterility*, 95(1), 50-60.
- Diedrich, K., Fauser, B. C. J. M., Devroey, P., & Griesinger, G. (2007). The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human reproduction update*, 13(4), 365-377.
- Du, W., Lv, M., Li, J., Yu, R., & Jiang, J. (2016). A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection. *Chemical Communications*, 52(86), 12721-12724
- Edgell, T. A., Rombauts, L. J., & Salamonsen, L. A. (2013). Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reproductive biomedicine online*, 27(5), 486-496.

- Egea, R. R., Puchalt, N. G., Escrivá, M. M., & Varghese, A. C. (2014). OMICS: current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *Journal of human reproductive sciences*, 7(2), 73.
- Eiken Chemical Co. (2019) "A Guide to LAMP primer designing" (PrimerExplorer V5)
- Elnashar, A. M., & Aboul-Enein, G. I. (2004). Endometrial receptivity. *Middle East Fertility Society Journal*, 9, 10-24.
- Elnashar, A. M., & Aboul-Enein, G. I. (2004). Opinion-Endometrial receptivity.
- Elsokkary, M., Eldin, A. B., Abdelhafez, M., Rateb, A., Samy, M., Eldorf, A., ... & Hemed, H. (2019). The reproducibility of the novel utilization of five-dimensional ultrasound and power Doppler in the prediction of endometrial receptivity in intracytoplasmic sperm-injected women: a pilot prospective clinical study. *Archives of gynecology and obstetrics*, 299(2), 551-558.
- Estella, C., Herrero, I., Moreno-Moya, J. M., Quiñero, A., Martínez, S., Pellicer, A., & Simón, C. (2012). miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization in vitro. *PloS one*, 7(7), e41080.
- Fatemi, H. M., & Popovic-Todorovic, B. (2013). Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reproductive biomedicine online*, 27(5), 530-538.
- Ferenczy, A., Bertrand, G., & Gelfand, M. M. (1979). Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *American journal of obstetrics and gynecology*, 133(8), 859-867.
- Fiedler, S., Schenker, J. G., Herman, A., & Lewin, A. (1996). The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. *Human reproduction update*, 2(4), 323-335.

- Franasiak, J. M., & Scott, R. T. (2017). Endometrial microbiome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 29(3), 146-152.
- Franasiak, J. M., Ruiz-Alonso, M., Scott, R. T., & Simón, C. (2016). Both slowly developing embryos and a variable pace of luteal endometrial progression may conspire to prevent normal birth in spite of a capable embryo. *Fertility and sterility*, 105(4), 861-866.
- Galliano, D., & Pellicer, A. (2014). MicroRNA and implantation. *Fertility and sterility*, 101(6), 1531-1544.
- Garcia-Moreno, A., Lopez-Dominguez, R., Ramirez-Mena, A., Pascual-Montano, A., Aparicio-Puerta, E., Hackenberg, M., & Carmona-Saez, P. (2021). GeneCodis 4: Expanding the modular enrichment analysis to regulatory elements. *bioRxiv*.
- Garrido-Gómez, T., Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Diaz-Gimeno, P., Vilella, F., & Simón, C. (2013). Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertility and sterility*, 99(4), 1078-1085.
- Gellersen, B., Brosens, I. A., & Brosens, J. J. (2007, November). Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 25, No. 06, pp. 445-453). © Thieme Medical Publishers.
- Gil Grande, L. A. (2008). Ecografía o ultrasonografía abdominal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(11), 729.
- Gnainsky, Y., Dekel, N., & Granot, I. (2014, September). Implantation: Mutual Activity of Sex Steroid Hormones and the Immune System Guarantee the Maternal–Embryo Interaction. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 32, No. 05, pp. 337-345). Thieme Medical Publishers.

- Góngora, J., Romero, B., Martínez, L., Fontes, J., & Mozas, J. (2016). Influencia del índice de masa corporal en los resultados de técnicas de reproducción asistida. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 3(1), 17-23.
- Grasso, A., Navarro, R., Balaguer, N., Moreno, I., Alama, P., Jimenez, J., ... & Vilella, F. (2020). Endometrial liquid biopsy provides a miRNA roadmap of the secretory phase of the human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(3), 877-889.
- Greening, D. W., Nguyen, H. P. T., Evans, J., Simpson, R. J., & Salamonsen, L. A. (2016). Modulating the endometrial epithelial proteome and secretome in preparation for pregnancy: The role of ovarian steroid and pregnancy hormones. *Journal of Proteomics*, 144, 99–112
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
- Gutiérrez Núñez, R., & Gutiérrez Alarcón, B. M. (2019). Implantación embrionaria. Algunos aspectos moleculares en la receptividad endometrial. *Revisión Bibliográfica. Multimed*, 23(1), 167-188.
- Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). Menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10.
- Hernández-Vargas, P., Muñoz, M., & Domínguez, F. (2020). Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Human Reproduction Update*, 26(2), 264-301.
- Hossain, M.M., Sohel, M.M.H., Schellander, K. et al. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res* 349, 679–690 (2012).
<https://doi.org/10.1007/s00441-012-1469-6>

- Hull, M. G., Glazener, C. M., Kelly, N. J., Conway, D. I., Foster, P. A., Hinton, R. A., ... & Desai, K. M. (1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 291(6510), 1693-1697
- Hull, M. L., & Nisenblat, V. (2013). Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reproductive biomedicine online*, 27(5), 515-529.
- KABIR, S. M., Hosseini, A., & REZAZADEH, V. M. (2008). Endometrial receptivity to implantation in humans: Biochemical and molecular aspects.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209-216.
- Koot, Y. E. M., Teklenburg, G., Salker, M. S., Brosens, J. J., & Macklon, N. S. (2012). Molecular aspects of implantation failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1943-1950.
- Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*, 101(10), 2087-2092.
- Koshiol, J., Wang, E., Zhao, Y., Marincola, F., & Landi, M. T. (2010). Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 19(4), 907-911.
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology*, 95(1), 15-10.
- Kresowik, J. D., Devor, E. J., Van Voorhis, B. J., & Leslie, K. K. (2014). MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biology of reproduction*, 91(1), 17-1.

- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N., & Pollard, J. W. (2010). Genomic Profiling of MicroRNAs and Messenger RNAs Reveals Hormonal Regulation in MicroRNA Expression in Human Endometrium¹. *Biology of Reproduction*, 82(4), 791–801.
- Leshkowitz, D., Horn-Saban, S., Parmet, Y., & Feldmesser, E. (2013). Differences in microRNA detection levels are technology and sequence dependent. *Rna*, 19(4), 527-538.
- Li, C., Li, Z., Jia, H., & Yan, J. (2011). One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Chem. Commun.*, 47(9), 2595–2597. doi:10.1039/c0cc03957h
- Li, C., Li, Z., Jia, H., & Yan, J. (2011). One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Chemical Communications*, 47(9), 2595-2597.
- Li, M. Q., & Jin, L. P. (2013). Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the protein profile expression in endometrial secretion. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(10), 1964.
- Liang, J., Wang, S., & Wang, Z. (2017). Role of microRNAs in embryo implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1), 1-11.
- López-Luna, A., Hernández-Melchor, D., Ramírez-Martínez, L., & López-Bayghen, E. (2018). The Genetic and Biochemical Blueprint of Endometrial Receptivity: Past, Present, and Future Factors Involved in Embryo Implantation Success. In *Modern Medical Genetics and Genomics*. IntechOpen

- Macaluso, M., Wright-Schnapp, T. J., Chandra, A., Johnson, R., Satterwhite, C. L., Pulver, A., ... & Pollack, L. A. (2010). A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertility and sterility*, 93(1), 16-e1
- Malhotra, N., Malhotra, J., Malhotra, N., Rao, J., Mishra, N., Kurjak, A., & Chervenak, F. A. (2010). Endometrial receptivity and scoring for prediction of implantation and newer markers. *Donald School Ultra-sound Obstet Gynecol*, 4, 439-446.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356.
- Maybin, J. A., & Critchley, H. O. (2015). Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Human reproduction update*, 21(6), 748-761.
- McLaren, J. F. (2012). Infertility Evaluation. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 39(4), 453–463. doi:10.1016/j.ogc.2012.09.001
- Mihm, M., Gangooly, S., & Muttukrishna, S. (2011). The normal menstrual cycle in women. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 229-236.
- MINSA-INS, 2011 Compendio de normativa ética para uso por los comités de ética en investigación / Elaborado por Gabriela Emperatriz Minaya Martínez, comp. y José Abel Gonzales Díaz URL:[https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/COMPENDIO%20DE%20ETICA\(3.2.2012\).pdf](https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/COMPENDIO%20DE%20ETICA(3.2.2012).pdf)
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(6): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

- Murray, M. J., Meyer, W. R., Zaino, R. J., Lessey, B. A., Novotny, D. B., Ireland, K., ... & Fritz, M. A. (2004). A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertility and sterility*, 81(5), 1333-1343.
- Nikas, George. "Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology." *Seminars in reproductive medicine*. Vol. 18. No. 03. Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- Noyes, R. W., Hertig, A. T., & Rock, J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 5(4), 561-564.
- Ouyang, T., Liu, Z., Han, Z., & Ge, Q. (2019). MicroRNA detection specificity: recent advances and future perspective. *Analytical chemistry*, 91(5), 3179-3186.
- Papanicolaou, G. N. (1923). Oestrus in mammals from a comparative point of view. *American Journal of Anatomy*, 32(3), 285-292.
- Parks, J. C., Patton, A. L., McCallie, B., Griffin, D. K., Schoolcraft, W. B., & Katz-Jaffe, M. (2015). Secreted endometrial microRNA gene regulators are critical for successful embryo implantation. *Fertility and Sterility*, 104(3), e339. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.07.1055
- Paulson, R. J., Sauer, M. V., & Lobo, R. A. (1990). Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 53(5), 870-874. doi:10.1016/s0015-0282(16)53524-9
- Pellicer, Antonio. (2005) *Perspectivas del Diagnóstico Genético Pre-implantación (DGP)*.
CCDER HUMANA

- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2015). Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 103(4), e27-e32.
- Prieto-Gómez, Ruth, Vidal-Seguel, Nicolás Enrique, Lizama-Pérez, Rodrigo Alberto, Miranda-Krause, Ricardo Esteban, Nahuelcura-Millán, Néstor Eusebio, Ortega-Silva, Marcelo Eduardo, Ottone, Nicolás Ernesto, & Deppe-Alberdi, Mariana. (2019). Interacción Endometrio Trofoblasto, en la Implantación Humana: Revisión de la Literatura. *International Journal of Morphology*, 37(2), 397-405. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000200397>
- Quinn, C. E., and R. F. Casper. "Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity." *Human reproduction update* 15.2 (2009): 229-236.
- Ramirez Moran, A. F., Cala Bayeux, Á., Fajardo Iglesia, D., & Scott Grave de Peralta, R. (2019). Factores causales de infertilidad. *Revista Información Científica*, 98(2), 283-293.
- Rashid, N. A., Lalitkumar, S., Lalitkumar, P. G., & Gemzell-Danielsson, K. (2011). Endometrial receptivity and human embryo implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66, 23-30.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K. M., & Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic acids research*, 35(17), 5944-5953.
- Roa-Meggo, Y. (2012). La infertilidad como problema de salud pública en el Perú. *Revista Peruana de ginecología y Obstetricia*, 58(2), 79-85.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA
URL <http://www.rstudio.com/>.

- Saare, M., Peters, M., Aints, A., Laisk-Podar, T., Salumets, A., & Altmäe, S. (2017). OMICs studies and endometriosis biomarker identification. In *Biomarkers for Endometriosis* (pp. 227-258). Springer, Cham.
- Salamonsen, L. A., Edgell, T., Rombauts, L. J., Stephens, A. N., Robertson, D. M., Rainczuk, A., ... & Hannan, N. J. (2013). Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertility and sterility*, 99(4), 1086-1092.
- Salamonsen, L. A., Evans, J., Nguyen, H. P., & Edgell, T. A. (2016). The microenvironment of human implantation: determinant of reproductive success. *American journal of reproductive immunology*, 75(3), 218-225.
- Schild, R. L., Knobloch, C., Dorn, C., Fimmers, R., Van Der Ven, H., & Hansmann, M. (2001). Endometrial receptivity in an in vitro fertilization program as assessed by spiral artery blood flow, endometrial thickness, endometrial volume, and uterine artery blood flow. *Fertility and Sterility*, 75(2), 361-366.
- Sha, A. G., Liu, J. L., Jiang, X. M., Ren, J. Z., Ma, C. H., Lei, W., ... & Yang, Z. M. (2011). Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertility and sterility*, 96(1), 150-155.
- Shahbazi, M. N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development*, 147(14), dev190629.
- Shi, C., Shen, H., Fan, L. J., Guan, J., Zheng, X. B., Chen, X., ... & Han, H. J. (2017). Endometrial microRNA signature during the window of implantation changed in patients with repeated implantation failure. *Chinese medical journal*, 130(5), 566.

- Sigurgeirsson, B., Ámark, H., Jemt, A., Ujvari, D., Westgren, M., Lundeberg, J., & Gidlöf, S. (2017). Comprehensive RNA sequencing of healthy human endometrium at two time points of the menstrual cycle. *Biology of reproduction*, 96(1), 24-33.
- Simón, C. (2009). *El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Solís Ramos, L. Y., & Andrade Torres, A. (2005). ¿Qué son los marcadores moleculares?
- Strassmann, B. I. (1996). Energy economy in the evolution of menstruation. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews*, 5(5), 157-164.
- Sun, H., Gong, T. T., Jiang, Y. T., Zhang, S., Zhao, Y. H., & Wu, Q. J. (2019). Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*, 11(23), 10952.
- Surrey, E. S. (2015). Endometriosis-related infertility: the role of the assisted reproductive technologies. *BioMed research international*, 2015.
- The Cochrane Collaboration (2020) Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.4
- Thi, V. L. D., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P., Kirrmaier, D., ... & Anders, S. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science translational medicine*, 12(556).
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*, 39(16), 7223-7233.
- Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martinez, S., ... Simon, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-

implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*, 142(18), 3210–3221. doi:10.1242/dev.124289

Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., ... & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*, 43(W1), W460-W466.

Wallach, E. E., Yaron, Y., Botchan, A., Amit, A., Peyser, M. R., David, M. P., & Lessing, J. B. (1994). Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*, 62(2), 225-232.

Wallach, E. E., Yaron, Y., Botchan, A., Amit, A., Peyser, M. R., David, M. P., & Lessing, J. B. (1994). Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*, 62(2), 225-232.

Wang, Y. A., Healy, D., Black, D., & Sullivan, E. A. (2008). Age-specific success rate for women undertaking their first assisted reproduction technology treatment using their own oocytes in Australia, 2002–2005. *Human reproduction*, 23(7), 1633-1638.

Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., ... & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*, 56(11), 1733-1741.

Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., Stedtfeld, T. M., Tiedje, J. M., & Hashsham, S. A. (2017). Quantification of microRNAs directly from body fluids using a base-stacking isothermal amplification method in a point-of-care device. *Biomedical microdevices*, 19(3), 45. <https://doi.org/10.1007/s10544-017-0191-2>

Xia, H. F., Cao, J. L., Jin, X. H., & Ma, X. (2013). MiR199a is implicated in embryo implantation by regulating Grb10 in rat. *Reproduction (Cambridge, England)*, 147(1), 91-99.

Xu J, Liu Y, Xie Y, Zhao C, Wang H. Bioinformatics Analysis Reveals MicroRNAs Regulating Biological Pathways in Exercise-Induced Cardiac Physiological Hypertrophy. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2850659. doi:10.1155/2017/2850659

Yuhao Chen and Xiaowei Wang (2020) miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research.* 48(D1):D127-D131.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... & Van der Poel, S. (2009). The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Human reproduction*, 24(11), 2683-2687.

Zhang, X., Lowe, S. B., & Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491–499.

IX. ANEXOS

Tabla 8. Lista de miARNs Diferencialmente expresados reportados según estudio, tipo de biopsia y método de detección

Estudio	Tipo de biopsia	Plataforma de detección	TOP miARNs DEGs	
			<i>Upstream</i>	<i>Downstream</i>
Altmae2012	Tejido	Agilent Microarray	hsa-miR-30b, hsa-miR-30d, hsa-miR-7g, hsa-miR-10a, hsa-miR-26b, hsa-mir-21	hsa-miR-424, hsa-miR-923
DaBroi2019	Tejido	RNA-seq	hsa-miR-574-5p	hsa-miR-6723-5p, hsa-miR-4485-3p
Drissenek2020	Tejido	Affymetrix Microarray	hsa-miR-41a, hsa-miR-1226-5p	hsa-miR-455-3p, SNORD82, hsa-miR-3148, hsa-miR-3128, hsa-miR-4445-3p, hsa-miR-4423-3p, hsa-miR-1468-3p, SNORD116-30
Estrella2012	Tejido	PCR	hsa-miR-95, hsa-miR-888, hsa-miR-936, hsa-miR-1185, hsa-miR-518, hsa-miR-548k, hsa-miR-593, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-29c, hsa-miR-449b, hsa-miR-300, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-891a, hsa-miR-365, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-33b, hsa-miR-541, hsa-miR-154, hsa-miR-376, hsa-miR-133a, hsa-miR-218, hsa-miR-22, hsa-miR-614, hsa-miR-369-3p, hsa-mir-185	hsa-miR-146a, hsa-miR-155, hsa-miR-181b, hsa-miR-181a, hsa-miR-135b, hsa-miR-181d, hsa-miR-200c, hsa-miR-141, hsa-miR-182, hsa-miR-429, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-200a, hsa-miR-96, hsa-miR-183, hsa-miR-9, hsa-miR-30a, hsa-miR-126
Grasso2019	Fluido	NGS	hsa-miR-141-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-345-5p, hsa-miR-873-3p, hsa-miR-30d-3p	
Kresowick2014	Tejido	TaqMan	hsa-miR-30b, hsa-miR-30d, hsa-miR-31	hsa-miR-135a, hsa-miR-135b, hsa-miR-145, hsa-miR-203, hsa-miR-503
Sha2011	Tejido	DeepSeq	hsa-miR-30d, hsa-miR-30b, hsa-miR-31, hsa-miR-21, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-203	hsa-miR-33a, hsa-miR-452, hsa-miR-125b, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-143,

				hsa-miR-100, hsa-miR-504, hsa-miR-424, hsa-miR-503
Shi2017	Tejido	Agilent Microarray	hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-449a, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-21-5p	hsa miR 1207 5p, hsa miR 4306, hsa miR 572, hsa miR 5739, hsa miR 6088
Sigurgeirsson2016	Tejido	Affymetrix Microarray	hsa-miR-200bc-3p/429, hsa-miR-30-5p, hsa-miR-148-3p/152-3p, hsa-miR-34-5p/449-5p, hsa-miR.378.3p/422, hsa-miR-345-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-1307-5p, hsa-miR-34-5p/2682-5p, hsa-miR-203-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-mir-501-3p/502-3p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-141-5p	hsa-miR-21-5p/590-5p, hsa-miR-143-3p/4770/6088, hsa-miR-125-5p/7153-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-142-5p/5590-3p, hsa-miR-29-3p, hsa-miR-145-5p/5195-3p, hsa-miR-132-3p/212-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-145-4p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-136-5p, hsa-135b-11-3p
Vilella2016	Fluido	Agilent Microarray	hsa-miR-455-5p, hsa-miR-450a, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-320a, hsa-miR-183, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-30d, hsa-miR-29b, hsa-miR-141, hsa-miR-200c, hsa-miR-30a, hsa-miR-210, hsa-miR-148a, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-29b, hsa-miR-200c, hsa-miR-29c, hsa-miR-210, hsa-miR-148a, hsa-miR-873

Tabla 9. Genes diana predichos a través de la plataforma Genecodis4 para las formas maduras de los miARNs seleccionados.

Micronas	Target Genes
hsa-miR-200c-3p	SIRT1, CCNE2, NOTCH1, NCAM1, KLF9, SEPTIN7, BMI1, E2F3, PTEN, ZEB2, BCL2, RHOA, TUBB3, KRAS, MYB, ZEB1, GATA4, SP1, ROCK2, ETS1, DNMT3A, VEGFA, BAP1, GEMIN2, DNMT3B, EFNA1, FOXO1, HOXB5, UBE2I, TBK1, IKBKB, FN1, SUZ12, CDK2, ZFPM2, JAZF1, PTPN13, ADAM12, EDNRA, DUSP1, RNF2, RCOR3, CRKL, TIMP2, BRD7, XIAP, KDR, ACVR2B, MSN, NTRK2, FLT1, RND3, ERRF1, FBLN5, NTF3, ZNF217, PMAIP1, NOS3, LPAR1, KLHL20, PTPRD, ELMO2, ERBIN, WDR37, VAC14, TCF7L1, RASSF2, RIN2, KLF11, SHC1, SEC23A, MYLK, UBQLN1, RPS6KB1, SH3PXD2A, USP25, CFL2, CDH11, MALAT1, HFE, DLC1, ATRX, BTC, ZFPM1, PIN1, PDCD10, HNF1B, PRKCZ, LEPR, DNAJC3, SLC1A2
hsa-miR-345-5p	NTRK3, CDKN1A, ABCC1
hsa-miR-30a-3p	NOTCH1, BECN1, RUNX2, CDK6, MECP2, SLC7A6, CEMIP2, THBS1, CCN1, XBP1, VEZT, NFATC3
hsa-miR-199b-5p	HIF1A, ERBB2, JAG1, SIRT1, HES1, NLK, SET, KIT, LAMC2, DDR1, PODXL, SETD2, GRB10, TAF9B, CCNL1, ITGA3
hsa-miR-30a-5p	DNMT1, CDH1, MBNL2, CCNE2, BDNF, TP53, ITGB3, SMAD1, NOTCH1, PRDM1, SOX4, ABL1, NCAM1, PIK3R2, TET1, BECN1, ESR2, SNAI1, RUNX2, VIM, TNRC6A, DTL, NT5E, MBNL1, MTDH, PIK3CD, KLF9, TAB3, ERG, SEPTIN7, AVEN, FOXD1, TUBB4B, NEUROD1, MBNL3, BCL9, HSPA5, SKP2, BCL11A, EYA2, IL21R, UBE3C, CBX3, ATF1, LOX, FOXL2, CD99, RPA1, HNF4G, NEDD4L, RAB38, TRAF3IP2, PRRT2
hsa-miR-200c-5p	CDH1, BMI1, E2F3, PTEN, CYP1B1

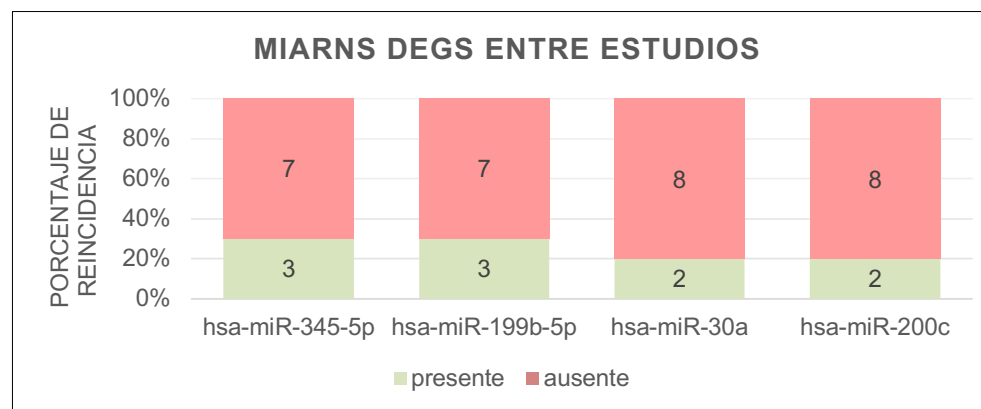


Figura 20. Porcentaje de reincidencia de miARNs entre estudios independientes