



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO 3042 MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Análisis del perfil de expresión de
microRNAs en tejido embrionario sano y
ectópico**

AUTOR:

Teresa Lozoya Araque
Licenciada en Medicina

DIRECTORES:

Dr. Francisco Domínguez Hernández
Prof. Antonio Pellicer Martínez
Prof. Alfredo Perales Marín

Valencia, 2016

Dr. Francisco Domínguez Hernández, doctor en Biología, editor asociado de la revista Human Reproduction e investigador principal de INCLIVA,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Análisis del perfil de expresión de microRNAs en tejido embrionario sano y ectópico”** ha sido realizado íntegramente por Doña Teresa Lozoya Araque bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 8 de julio de 2016.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández

Prof. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático en medicina de la Universidad de Valencia, presidente y director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) y de la fundación IVI,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Análisis del perfil de expresión de microRNAs en tejido embrionario sano y ectópico**” ha sido realizado íntegramente por Doña Teresa Lozoya Araque bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 13 de julio de 2016.

Fdo. Prof. Antonio Pellicer Martínez

Prof. Alfredo Perales Marín, Jefe de Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología de la Facultad Medicina de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Análisis del perfil de expresión de microRNAs en tejido embrionario sano y ectópico”** ha sido realizado íntegramente por Doña Teresa Lozoya Araque bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 15 de julio de 2016.

Fdo. Prof. Alfredo Perales Marín

El presente proyecto de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la colaboración del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y la Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad (FIVI).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar mi más sincero agradecimiento al doctor Francisco Domínguez, al profesor Antonio Pellicer y al profesor Alfredo Perales, mis directores de tesis, pues sin ellos este trabajo habría sido completamente imposible. Gracias Paco, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por tus consejos y servirme como guía, ofreciéndome tu apoyo y ánimo en los momentos más difíciles de este proyecto. Gracias profesor Pellicer, por idear este trabajo y contar conmigo para realizarlo, por la gran sabiduría transmitida en estos años y por hacerme comprender la importancia de combinar clínica e investigación para el avance de la ciencia. Gracias profesor Perales, por la paciencia y ayuda inestimable durante este tiempo.

Agradecer también a Mercedes, Sebas y Juanma, por estar ahí cuando los he necesitado. Vuestros detalles y gran profesionalidad en el manejo de muestras, tubos, reactivos, gráficas... me han hecho la vida más fácil.

Merecen también un reconocimiento mis compañeros del Hospital la Fe, mi segunda casa estos últimos años: residentes, adjuntos, enfermería y auxiliares, por su paciencia y ayuda en esta labor, pensando siempre en mí ante un posible caso para el trabajo. Gracias amigos.

Gracias al doctor Manuel Tena Sempere y su equipo, por su trabajo y colaboración inestimable.

Gracias también a la Fundación IVI por permitir que todo esto haya sido posible.

No puedo olvidar tampoco a todas esas pacientes que han aceptado participar en este proyecto. No hay palabras para agradecerles que incluso en un momento difícil de sus vidas, en el que su ilusión de ser madres se ve truncada y acabando de recibir una mala noticia, hayan querido participar desinteresadamente.

Gracias a mi familia. A mi hermano David, porque además de ser mi hermano pequeño y compañero de risas y anécdotas, es también mi amigo. Sé que siempre tendré un apoyo y él lo tendrá conmigo. Soy tu referencia en algunas cosas, pero tú también lo eres para mí en muchas otras. A mis padres, porque hoy soy todo lo que soy, personal y profesionalmente, gracias a ellos. Por su esfuerzo y dedicación constante, orientando toda su vida a hacernos la nuestra lo más perfecta posible. Sois la mejor familia que podría tener.

Gracias Roge, por entenderme y creer en mí. Por actuar de compañero de vida y de profesión. Nadie mejor que tú entiende mis dudas, inquietudes o un mal día. Significa mucho para mí el apoyo que siempre encuentro en ti sea cual sea la decisión que he de tomar.

ÍNDICE

1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1 Embarazo de curso normal	2
1.2 Embarazo ectópico	11
1.3 MicroRNAs	25
2. <i>HIPÓTESIS</i>	32
3. <i>OBJETIVOS</i>	34
3.1 Objetivos generales	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4. <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	36
4.1 Aprobación ética	37
4.2 Diseño del estudio	37
4.3 Muestras	40
4.4 Extracción del RNA	40
4.5 Microarrays, análisis de componentes principales y clustering	41
4.6 Validación PCR en tiempo real	42
4.7 Análisis bioinformático de los genes diana y determinación de funciones regulados por los microRNAs seleccionados	43
4.8 Transfección de microRNAs en la línea celular JEG3	43
4.9 Validación de la eficacia de transfección mediante PCR cuantitativa.....	44
4.10 Análisis estadístico.....	44
5. <i>RESULTADOS</i>	45
5.1 Comparación mediante microarrays de microRNA entre tejido de EE y controles IVE.....	46
5.2 Validación de los microRNAs en tejido embrionario mediante PCR en tiempo real.....	49

5.3	Estudios bioinformáticos de dianas de los microRNAs y vías de señalización.....	52
5.4	Análisis de la expresión de los genes diana por PCR a tiempo Real	57
5.5	Transfección in vitro de miR-196b y miR-223 en la línea celular trofoblástica JEG3.....	59
6.	<i>DISCUSIÓN</i>	62
7.	<i>CONCLUSIONES</i>	69
8.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	71
9.	<i>ANEXOS</i>	85

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Desarrollo del cigoto

Figura 2. Implantación embrionaria

Figura 3. Sincitiotrofoblasto

Figura 4. Disco germinativo

Figura 5. Embrión y decidua

Figura 6. Estructura placentaria

Figura 7. Imagen ecográfica de gestación ectópica

Figura 8. Mecanismos de regulación de los microRNAs en el proceso de implantación

Figura 9. Síntesis de microRNAs

Figura 10. Lista de los microRNAs expresados diferencialmente en el tejido embrionario

Figura 11. Validación mediante PCR en tiempo real en EE e IVEs

Figura 12. Segunda validación de los microRNAs en EE e IVEs mediante PCR en tiempo real

Figura 13. Genes afectados por los microRNAs de la vía de señalización ErbB

Figura 14. Vías de señalización de la biosíntesis de mucina tipo O-glicano

Figura 15. Genes predichos y validación génica

Figura 16. Transfección de las líneas celulares trofoblásticas con miR-196 y miR-223

Tabla 1. Principales moléculas estudiadas en el embarazo ectópico

Tabla 2. Características de las pacientes de las muestras estudiadas para los arrays

Tabla 3. Características de las pacientes de las muestras estudiadas con PCR en tiempo real

Tabla 4. Primers empleados para amplificar microRNAs en PCR en tiempo real

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Embarazo de curso normal

El embarazo de curso normal es un proceso estrictamente regulado cuyo éxito es esencial para la reproducción y la supervivencia de las especies. En este proceso intervienen multitud de sistemas de control enormemente sofisticados, que engloban múltiples vías de señalización, en las cuales intervienen diversos tejidos, entre ellos el tejido embrionario y la placenta. Si alguno de estos mecanismos no se desarrolla adecuadamente pueden aparecer diferentes patologías de la gestación, entre las cuales se encuentra el embarazo ectópico.

Por ello, es necesario un adecuado desarrollo y regulación de todos los procesos desde etapas muy tempranas de la gestación, como el transporte del ovocito, la fecundación, la segmentación embrionaria, que detallaremos a continuación.

1.1.1 Transporte del ovocito, fecundación y segmentación

Tras la ovulación, el ovocito es dirigido hacia la trompa, gracias a los movimientos de las fimbrias y de los cilios de las células epiteliales tubáricas, todo ello condicionado en gran parte por el ambiente endocrino que tiene lugar durante el proceso periovulatorio (Sadler 2004, Ezzati *et al* 2014).

El espermatozoide alcanza la trompa de Falopio, y tras su unión con el óvulo, multitud de mecanismos moleculares se ponen en marcha, generando un cambio en el ovocito para que se oriente a la segmentación, mediante la cual el cigoto sufre una serie de divisiones, dando lugar a diferentes etapas del desarrollo embrionario como la mórula y el blastocisto (figura 1). La mórula está compuesta por 16 células; las células con situación central constituirán la masa celular interna (tejidos embrionarios); las células de alrededor constituirán la masa celular externa (trofoblasto, y por tanto futura placenta). Las células trofoblásticas mantienen zonas de unión entre sí; se ha observado, aunque no está clara su relación, la presencia de cadherina E en las células que se diferencian a trofoblasto, pudiendo ser consecuencia (o presencia necesaria) de la diferenciación a trofoblasto.

El cigoto llega a la cavidad uterina aproximadamente al tercer día, contribuyendo a ello sustancias como la progesterona y la relajación de estructuras como los ostia tubáricos (Sadler 2004, Carlson 2014).

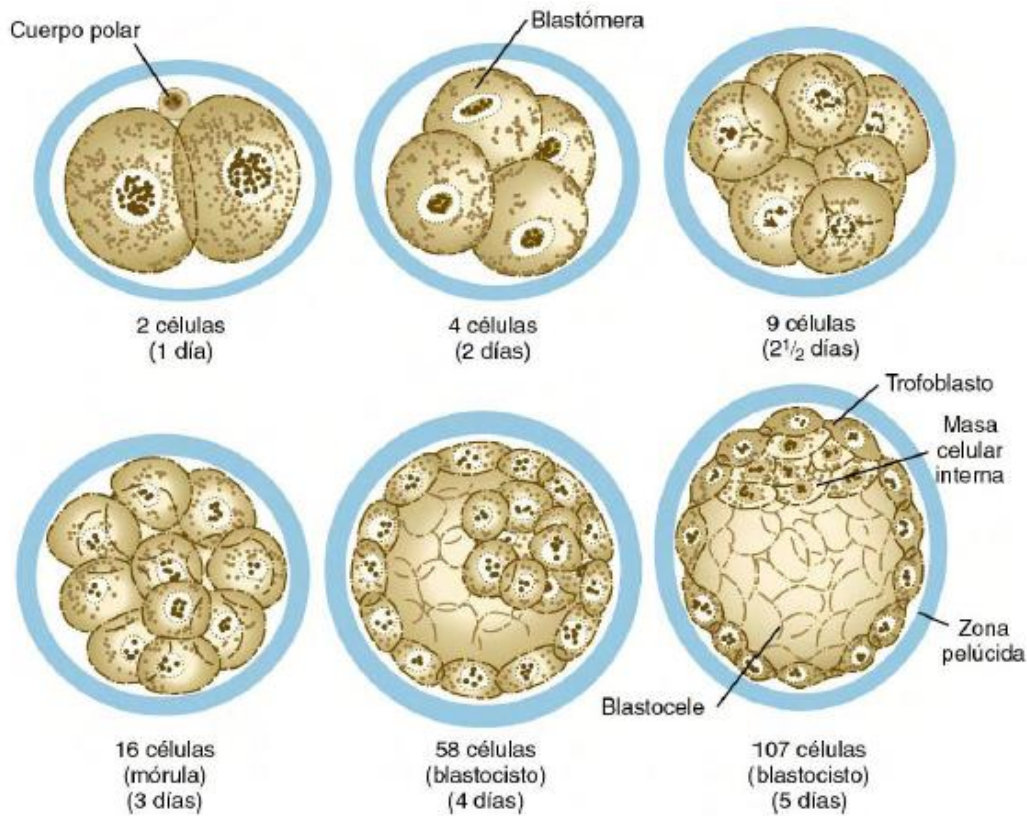


Figura 1. Desarrollo del cigoto desde la fecundación mediante segmentación (tomado de Carlson 2014)

1.1.2 Implantación embrionaria

La mórula comienza a introducirse en la cavidad uterina; en su interior se forma una cavidad, el blastocele. La masa celular interna entonces pasa a denominarse embrioblasto, situándose en un polo, y la masa celular externa, trofoblasto. Hacia el quinto día desaparece la zona pelúcida, y gracias a determinadas moléculas secretadas por las células trofoblásticas, el blastocisto interactúa con el endometrio; se inicia así el proceso de implantación entre los orificios glandulares de las paredes del cuerpo uterino, hacia el octavo día de desarrollo (Larsen 2003) (figura 2).

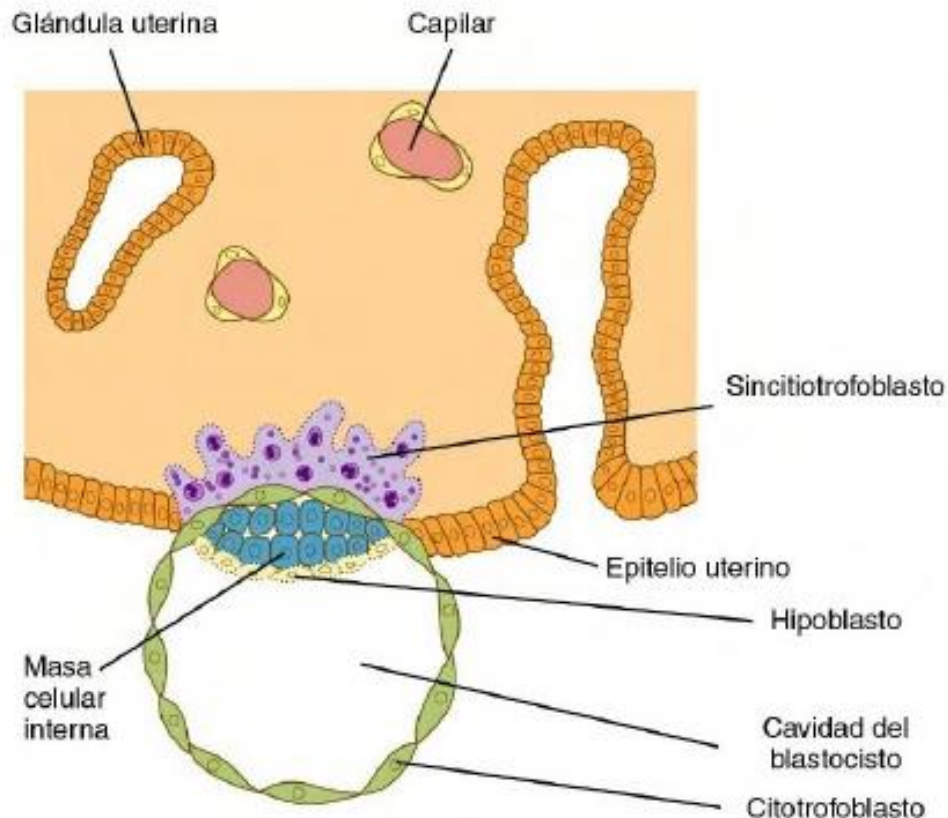


Figura 2. El blastocisto comienza a penetrar en el endometrio hacia el sexto día de desarrollo embrionario (tomado de Carlson 2014)

En esa invasión endometrial intervienen multitud de procesos y mediadores moleculares expresados por los diferentes tejidos en desarrollo, como integrinas (expresadas por el trofoblasto), laminina, fibronectina y otras que favorecen procesos como la adhesión y la migración celular, entre otros.

Por otro lado, todos estos mecanismos moleculares forman parte de redes de señalización para la regulación de la diferenciación de las células trofoblásticas, por lo que la implantación es necesariamente el resultado de una adecuada regulación de múltiples cascadas de señalización y la apropiada interacción y coordinación por parte de ambos, endometrio y tejido trofoblástico, siendo necesario un ambiente hormonal adecuado y rico en nutrientes para su éxito. Además, es posible que la invasión se produzca por la zona próxima a la zona embrionaria, por lo cual podrían existir funciones distintas dentro de las mismas células trofoblásticas.

En lo que al útero se refiere, el momento del ciclo ideal para la implantación es la fase secretora. En ella, se produce una gran congestión del tejido, observándose distintas capas, una

capa superficial, una capa esponjosa y una capa basal, cargado de sustancias como glucógeno y lípidos.

Finalmente, el embrión se introduce en el estroma endometrial, cerrándose el punto de entrada mediante el epitelio endometrial y fibrina.

Determinadas alteraciones en todo este complejo mecanismo de la implantación podrían originar diversas patologías de la gestación, como el mismo embarazo ectópico, (en el que podría existir una implantación demasiado precoz), suponiendo también multitud de problemas en campos como el de la reproducción asistida y el fallo de implantación (Moore 2008).

1.1.3 Invasión embrionaria

Una vez el blastocisto está incluido en el estroma endometrial, el trofoblasto se ha diferenciado en dos capas: el citotrofoblasto (células mononucleadas) y el sincitiotrofoblasto (células multinucleadas). El sincitiotrofoblasto será el responsable de la producción de la hormona coriagonadotropina humana (hCG), así como de la transformación del cuerpo lúteo en el cuerpo lúteo del embarazo.

El embrioblasto también se diferencia en dos capas: la capa epiblastica y la capa hipoblastica o endodermo primitivo.

El sincitiotrofoblasto sufre un gran desarrollo durante esta etapa; conforme avanza penetra en el estroma erosionando vasos sanguíneos y destruyendo glándulas endometriales, apareciendo vacuolas que confluyen para formar las lagunas vasculares (figura 3).

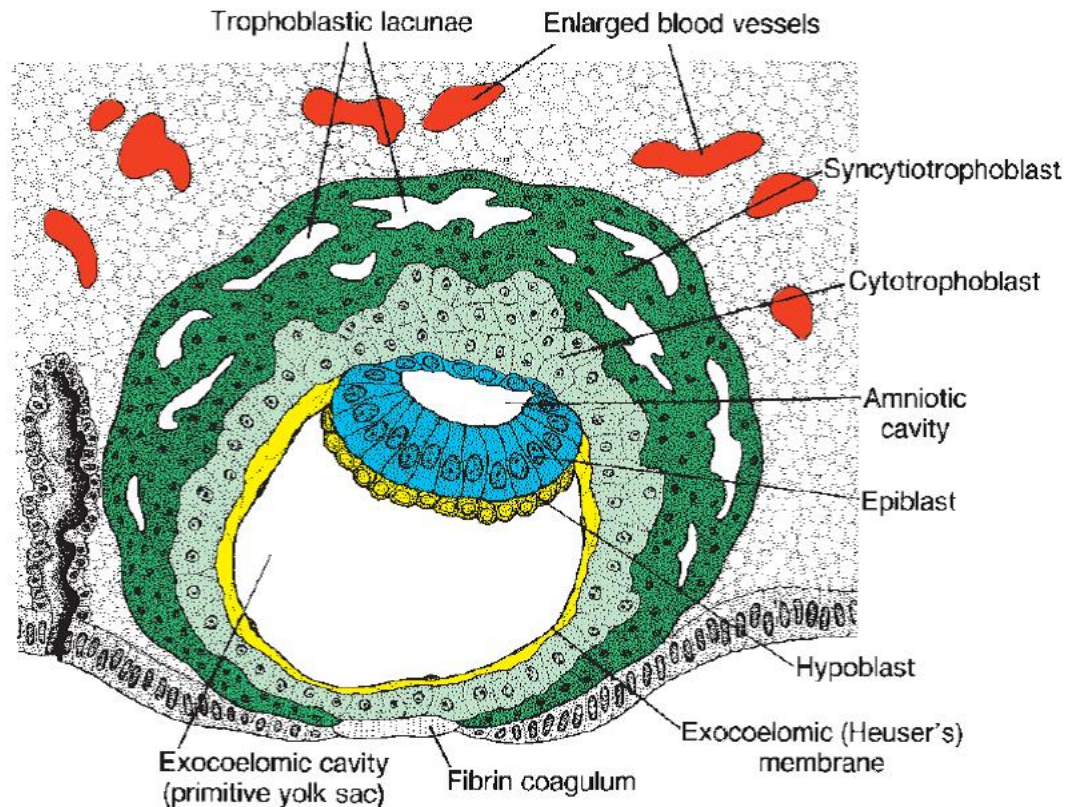


Figura 3. Representación del sincitiotrofoblasto con múltiples lagunas vasculares (tomado de Sadler 2004)

Hacia el día 13, el trofoblasto presenta estructuras vellosas. El citotrofoblasto se divide y se introduce en el sincitiotrofoblasto, formándose pilares de células rodeados de sincitiotrofoblasto: son las vellosidades primarias (Sadler 2004, Arteaga 2014).

1.1.4 Disco germinativo trilaminar. Gástrula

Durante la tercera semana de gestación tiene lugar la formación de la gástrula, compuesta por tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. El proceso se inicia hacia el día 15 del desarrollo embrionario con la aparición de la línea primitiva en la superficie epiblastica (figura 4). Cada una de las hojas embrionarias dará lugar a los diferentes tejidos del embrión (López Sánchez *et al* 2013).

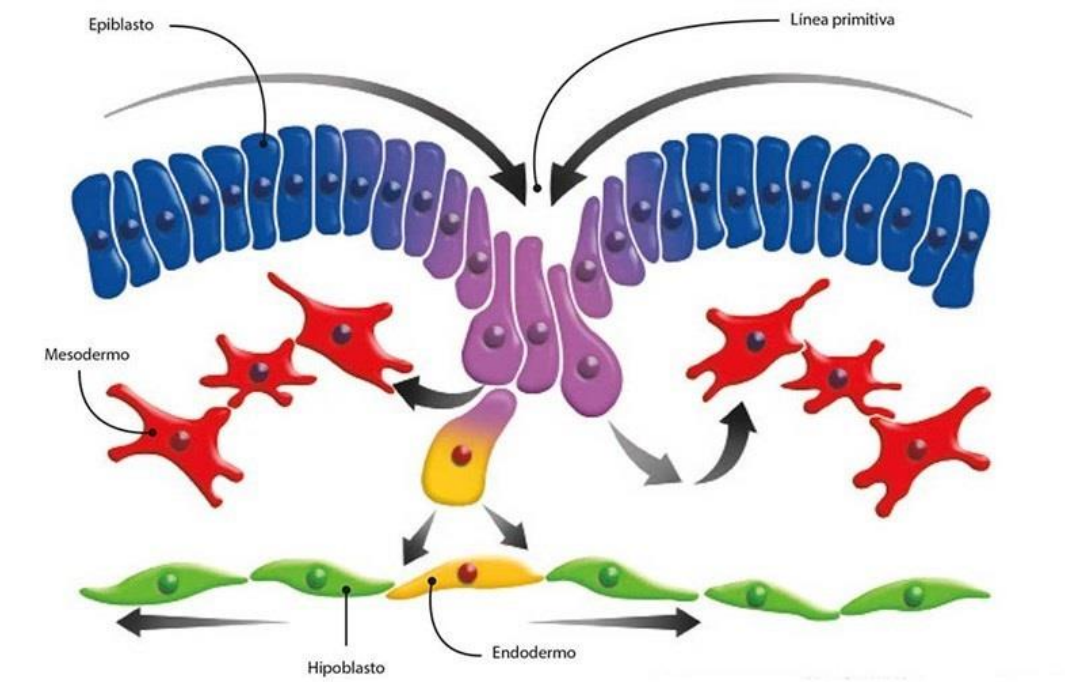


Figura 4. Disco germinativo. Movimiento e invaginación de células epiblasticas a través de nódulo y línea primitivos (tomado de Arteaga 2014)

Una vez más, multitud de mecanismos moleculares se han visto implicados en el trascurso adecuado de la gastrulación. Un ejemplo son las moléculas de adhesión celular (las llamadas CAM), entre las cuales se encuentra la cadherina E, siendo su regulación muy importante durante el proceso de migración celular y formación de mesodermo organizado, perdiéndose o recuperándose su expresión con la transformación celular (Carlson 2014).

1.1.5 Desarrollo del trofoblasto. Corion y decidua

En la tercera semana de gestación el trofoblasto consta de vellosidades primarias, constituidas por citotrofoblasto cubierto por sincitiotrofoblasto. Posteriormente, las células mesodérmicas penetran en estas vellosidades, dando lugar a las vellosidades secundarias. Al final de la tercera semana de desarrollo las células mesodérmicas de la parte central de la vellosidad secundaria comienzan a diferenciarse en células sanguíneas y vasos, formando el sistema capilar vellositario, dando lugar a la vellosidad terciaria y definitiva. Estos capilares contactan con los capilares del mesodermo de la lámina coriónica y el pedículo de fijación, quedando así en contacto placenta y embrión. Las células del citotrofoblasto de las vellosidades se introducen progresivamente en el sincitio adyacente, formando la envoltura citotrofoblástica

externa.

Hacia la octava semana del desarrollo, el trofoblasto está compuesto por abundantes vellosidades secundarias y terciarias ancladas a la lámina coriónica y periféricamente a la decidua materna mediante la envoltura citotrofoblástica externa. En el centro de las vellosidades se desarrollará un árbol capilar que contactará con los capilares del pedículo de fijación y de la lámina coriónica, originando el sistema vascular extraembrionario.

Posteriormente las vellosidades de anclaje se prolongan dirigiéndose hacia los espacios intervillosos, desapareciendo, hacia la semana 16 de gestación, las células de citotrofoblasto.

Conforme la gestación progresa, las vellosidades de la zona embrionaria crecen, dando lugar al corion frondoso, mientras que las vellosidades del polo no embrionario se atrofian, dando lugar al corion leve. Además, la capa endometrial que cubre el corion frondoso será denominada decidua basal, mientras que la decidua que cubre el corion leve es la decidua capsular. El corion leve, con el desarrollo, contacta con la pared uterina (la decidua parietal), fusionándose de esta forma ambas capas. Por tanto, será el corion frondoso junto con la decidua basal los elementos que darán lugar a la futura placenta (Arteaga 2014) (figura 5).

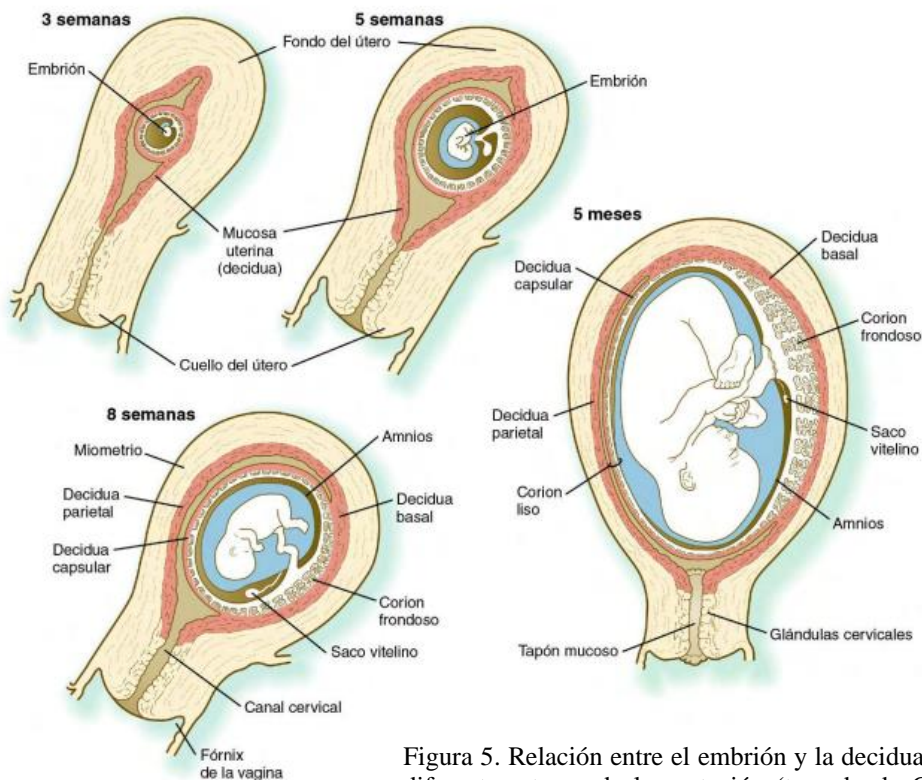


Figura 5. Relación entre el embrión y la decidua en las diferentes etapas de la gestación (tomado de Carlson 2014)

1.1.6 Placenta. Estructura y funciones

Hacia el final de la tercera semana de gestación ya se han establecido las disposiciones oportunas para los intercambios necesarios materno-filiales. En la octava semana las vellosidades coriónicas cubren la totalidad del saco coriónico. Al inicio del cuarto mes de gestación la placenta consta de una parte fetal (corion frondoso) y una parte materna (decidua basal), rodeados respectivamente por la lámina coriónica y la lámina decidual. Existe una zona de unión en la cual se mezclan células deciduales y trofoblásticas, y espacios entre sus láminas, los espacios intervillosos.

Hacia el quinto mes de gestación la decidua forma tabiques que se proyectan hacia la placa coriónica y que dividen la placenta en cotiledones, compuesto cada uno de ellos por dos o más troncos vellosos, con multitud de ramas cada uno, manteniéndose siempre una separación entre sangre materna y tejido fetal a la vez que existe contacto entre espacios de los diferentes cotiledones placentarios. Los cotiledones son irrigados por las arterias espirales, que penetran en los espacios intervillosos. La denominada barrera placentaria estará formada, por tanto, por endotelio fetal, tejido conectivo vellositario, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. Esta membrana se adelgaza notablemente con el fin de aumentar el intercambio, existiendo una amplia superficie de contacto e intercambio.

Entre las diferentes funciones placentarias encontramos la producción de hormonas (progesterona, estriol, hCG, lactógeno placentario), intercambio de nutrientes, electrolitos y gases, transmisión de sustancias como anticuerpos de origen materno, protección, excreción de sustancias tóxicas para el embrión, metabolismo, etc (Arteaga 2014).

Especial interés despierta la función endocrina de la placenta, ya que el sincitiotrofoblasto sintetiza hormonas proteicas y esteroideas; algunas de estas sustancias, como la hCG, son detectadas para el diagnóstico de gestación, aumentando su concentración al máximo en sangre y orina hacia la octava semana de gestación para disminuir posteriormente. Entre las hormonas esteroideas están la progesterona y los estrógenos. La detección de algunas de estas sustancias, puede suponer, no solo el diagnóstico de gestación, sino de algunas posibles complicaciones (Reis *et al* 2002).

Hacia el término, la placenta consta de unos 20 cotiledones, cubiertos por decidua basal. La superficie fetal está cubierta totalmente por la lámina coriónica. Los vasos coriónicos convergen hacia el cordón umbilical y el corion está cubierto por el amnios. Conforme avanza la gestación se produce un aumento de tejido fibroso en el centro de las vellosidades, se obliteran

pequeños capilares, se deposita fibrinoide en las vellosidades y las membranas basales de los capilares fetales aumentan su grosor (Sadler 2004) (figura 6).

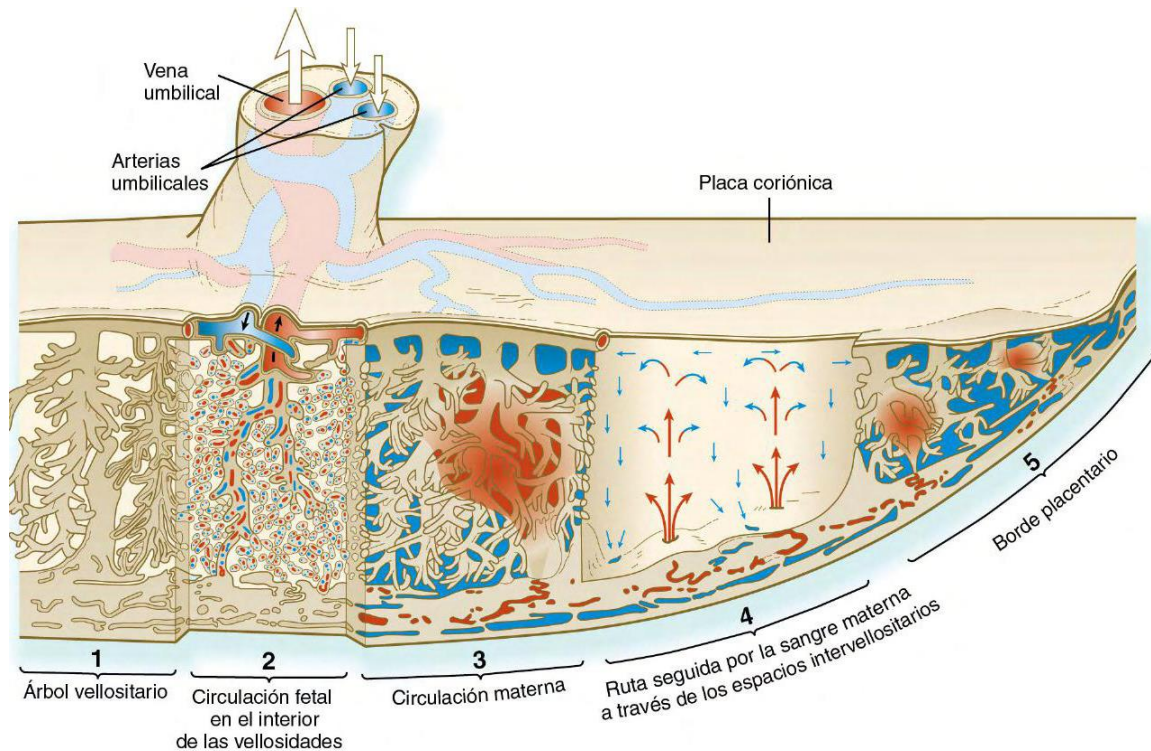


Figura 6. Estructura placentaria. Cotiledones separados por tabiques placentarios (tomado de Carlson 2014)

Un aspecto también interesante es el que considera la placenta como una estructura invasora de estirpe pseudotumoral. Se trata de una estructura con potencial invasor equiparable al de las células cancerosas, y son necesarios determinados mecanismos que limiten ese potencial invasor y adherencia. Determinadas sustancias, como factores de transcripción, se han visto implicadas en este proceso. Es el caso del factor de crecimiento TGF- β , producido en gran parte por la decidua, que proporciona un gran control de la proliferación e invasión de determinado tipo de células trofoblásticas, habiéndose observado una resistencia en los casos de coriocarcinoma a las señales inhibitorias de este factor de crecimiento, en el cual las células penetran la decidua basal, los vasos sanguíneos y linfáticos, privando al útero de esta protección frente a la invasión (Moore 2008).

1.2 Embarazo ectópico

1.2.1 Definición

Un embarazo ectópico es aquel que tiene lugar con la implantación del blastocisto fuera de la cavidad endometrial, siendo el lugar de implantación, hasta en el 95,5% de los casos, la trompa de Falopio, principalmente en la porción ampular (73,3%), siendo istmo (12,5%), fimbria (11,6%) y cornual (2,6%) localizaciones menos frecuentes (Barnhart *et al* 2009, Bouyer *et al* 2002). El 3,2% de los casos tiene lugar en el ovario, y el 1,3% sucede en otras localizaciones abdominales (Varma *et al* 2009). El embarazo ectópico es una causa importante de morbilidad materna de etiología no del todo conocida.

1.2.2 Epidemiología e importancia del tema

Su incidencia es del 1-2% de todos los embarazos reportados (Farquar *et al* 2005), siendo la principal causa de muerte materna en las primeras etapas de la gestación (4-10% de muertes relacionadas con el embarazo) (Horne *et al* 2010), a pesar de la mejora progresiva en los métodos de diagnóstico. Además, es causa de un gran espectro de complicaciones, como es el dolor pélvico, la necesidad de transfusión sanguínea, complicaciones derivadas del tratamiento, problemas de fertilidad y psicológicos (Horne *et al* 2010). Su incidencia está en aumento en los últimos años, relacionado con el incremento de sus principales factores de riesgo (CDC 1995, Fylstra *et al* 1998), si bien su mortalidad ha disminuido en los últimos años (Creanga *et al* 2011). En los países en vías de desarrollo, se ha descrito una incidencia todavía más alta, produciéndose, en 1 de cada 10 mujeres con diagnóstico de embarazo ectópico, la muerte (Leke *et al* 2004). Es una de las urgencias quirúrgicas más frecuentes del primer trimestre, y sus signos y síntomas son muy escasos y poco característicos.

1.2.3 Otros conceptos

Embarazo heterotópico

El embarazo heterotópico es aquél en el cual existe una combinación de embarazo intrauterino junto con una gestación ectópica en cualquier otra localización. Su incidencia está en aumento, posiblemente debido al aumento de empleo de las técnicas de reproducción asistida.

Embarazo de localización desconocida (pregnancy of unknown location)

El embarazo de localización desconocida (PUL) es la ausencia de localización de embarazo (intra o extrauterino) mediante ecografía, siendo los niveles de β hCG inferiores a 1000-1500 UI/L. Existen trabajos que indican que un 55% de los embarazos de localización desconocida se resolvería espontáneamente; un 34% sería finalmente un embarazo viable, mientras que un 11% de los mismos se diagnosticaría finalmente como embarazo ectópico (Condous *et al* 2004).

Embarazo en cicatriz de cesárea anterior

Se trata del 6% de los embarazos ectópicos que suceden en pacientes con cesárea anterior, posiblemente debido a una migración del embrión a través de un defecto de la cicatriz. No parece estar relacionado el aumento de riesgo de gestación ectópica en cicatriz con el número de cesáreas anteriores que presente la paciente (Rotas *et al* 2006, Ash *et al* 2007).

1.2.4 Mecanismos implicados

La etiología del embarazo ectópico no está clara. En los humanos, el transporte de los gametos masculinos y femeninos, la fecundación, el desarrollo embrionario inicial y el transporte embrionario al útero tiene lugar en las trompas de Falopio (Jansen *et al* 1984). Tras la fecundación, tal y como se ha mencionado, es necesario un transporte apropiado del embrión hacia la cavidad uterina (Barnhart *et al* 2009), aunque algunos autores defenderían la hipótesis de la combinación de la retención del embrión dentro de la trompa de Falopio debido a una alteración en el transporte embrionario a través de ella, junto con alteraciones en el medio ambiente de las trompas permitiendo una implantación excesivamente temprana (Shaw *et al* 2010).

Implantación y placentación se producen de manera apropiada a consecuencia de una relación estrechamente regulada entre tejidos fetales y maternos, cuyo proceso es regulado por gran multitud de moléculas y receptores (Guzeloglu-Kayisli *et al* 2007). Durante la implantación del blastocisto se generan dos tipos celulares, el trofoblasto veloso y el extraveloso. La placentación fisiológica se caracteriza por la invasión de las arterias espirales uterinas por parte del trofoblasto extraveloso. La fisiología de la gestación depende de los cambios estructurales y funcionales adecuados del trofoblasto veloso y extraveloso (Lunghi *et*

al 2007); la invasión anómala del trofoblasto conducirá a un amplio espectro de complicaciones, entre las que se encuentran las gestaciones ectópicas, la dificultad de desarrollar una gestación a término y alteraciones en la fertilidad y el éxito reproductivo en futuros embarazos (Norwitz *et al* 2001, Straszewski-Chavez *et al* 2005).

La correcta placentación es, pues, consecuencia del adecuado desarrollo de dos componentes fundamentales: la decidua (parte materna) y el corion (parte fetal). La placenta comienza a desarrollarse con la generación del trofoblasto a partir del trofoectodermo blastocitario. Este trofoblasto posteriormente se diferencia en dos componentes: el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto (Straszewski-Chavez *et al* 2005). Alteraciones en este proceso pueden ser origen de cambios en determinados marcadores tisulares (y posiblemente circulantes en la madre), relacionados con el adecuado desarrollo trofoblástico (Reis *et al* 2002, Straszewski-Chavez *et al* 2005). La detección de dichas alteraciones posee potencialmente un valor diagnóstico (y al ser detectado en etapas precoces, pronóstico), en diversas patologías de la gestación.

Algunos mecanismos implicados en el transporte del embrión hacia la cavidad uterina también han sido estudiados. Se ha observado un epitelio tubárico con menor densidad de cilios en pacientes con embarazo ectópico comparado con pacientes con embarazos intrauterinos (Vasquez *et al* 1983), sugiriendo un transporte enlentecido en las pacientes con embarazo ectópico.

Por otro lado, en el embarazo ectópico tubárico se ha apreciado un aumento de los niveles de óxido nítrico sintetasa inducible, pudiendo contribuir a un aumento de óxido nítrico que podría resultar en la alteración de la contractilidad y el batido ciliar de las trompas de Falopio, pudiendo contribuir al transporte más lento de los embriones hacia la cavidad uterina (Shaw *et al* 2010).

Las células intersticiales de Cajal, demostradas en la trompa de Falopio por Popescu *et al* en 2005, podrían jugar también un papel importante en la etiología del embarazo ectópico. La respuesta inflamatoria debido a infección por clamidia alteraría la regulación de la óxido nítrico sintetasa inducible, causando una interrupción en la actividad de las células intersticiales de Cajal, con una interrupción de la contractilidad de la muscular y con una reducción de la velocidad de transporte del embrión a través del oviducto.

1.2.5 Factores de riesgo para el embarazo ectópico

Más de la mitad de los embarazos ectópicos diagnosticados no están asociados con ningún factor de riesgo conocido (Dart *et al* 2002, Varma *et al* 2009). Aun así, los factores de riesgo más frecuentemente relacionados con dicha patología, por favorecer un transporte enlentecido y/o una implantación temprana, son los siguientes:

Edad mayor de 35 años

La edad avanzada estaría relacionada con una mayor probabilidad de exposición a los diferentes factores de riesgo descritos en la literatura (mayor número de infecciones por clamidia y gonococo y tabaquismo), con la presencia de alteraciones en la trompa de Falopio (peor funcionamiento de cilios y enlentecimiento del transporte del cigoto) y aumento de anomalías cromosómicas en el tejido trofoblástico (Storeide *et al* 1997, Sivalingam *et al* 2011), aunque esto último está muy debatido.

Historia de embarazo ectópico previo

Algunos autores afirman que pacientes con historia previa de embarazo ectópico tendrían 12,5 veces más riesgo de presentar otra gestación ectópica respecto a aquellas pacientes que nunca han sufrido esta condición, y 76,6 veces más riesgo de sufrir un tercer embarazo ectópico en caso de pacientes con historia de dos embarazos ectópicos anteriores. Existe un riesgo de recurrencia del 5-20% en caso de embarazo ectópico anterior y del 32% si existen más embarazos ectópicos anteriores, siendo algo menor este riesgo en caso de que haya existido una gestación intrauterina (Sivalingam *et al* 2011).

Historia de aborto espontáneo o voluntario previo

En el caso de abortos espontáneos, las opiniones son muy controvertidas, habiendo estudios a favor y estudios en contra respecto al aumento del riesgo de embarazo ectópico en pacientes con historia de aborto espontáneo, pudiendo jugar un papel clave en la relación de ambas patologías la presencia de infección, factores inmunológicos alterados y/o alteraciones hormonales (Moini *et al* 2014). En lo que a interrupciones voluntarias de la gestación se refiere, determinados estudios afirman que existe un aumento del riesgo de casi 2 veces de sufrir embarazo ectópico en aquellas pacientes que presenten historia de dos o más interrupciones voluntarias del embarazo (Barnhart *et al* 2006).

Historia de cirugía pélvica o abdominal

Existe disparidad de opiniones al respecto, existiendo trabajos que afirman desde la no asociación de la cirugía abdominopélvica con el embarazo ectópico hasta odds ratios (OR) de 2,45 a 5 (Moini *et al* 2014). Antecedentes quirúrgicos que pudieran provocar adherencias y distorsión de la anatomía, como por ejemplo quistectomías ováricas, cesárea, cirugía vesical y apendicectomía (Sivalingam *et al* 2011) podrían aumentar el riesgo de padecer embarazo ectópico.

Daño tubular

La historia previa de daño tubular, por cualquier circunstancia, incluida la cirugía tubárica (incluyendo también la esterilización) debido a la distorsión anatómica y funcional (ciliar) que puede tener lugar en el oviducto podrían aumentar el riesgo de embarazo ectópico. Algunos autores afirman que el antecedente de una cirugía tubárica previa aumentaría el riesgo de embarazo ectópico en 4,7 veces. (Ankum *et al* 1996), si bien podría existir un factor de confusión, pudiendo ser el origen del aumento del riesgo la propia cirugía, o la patología que la condicionó.

Oclusión tubárica

La presencia de una trompa ocluida con la trompa contralateral permeable podría predisponer a embarazo ectópico, dado que los espermatozoides viajarían a través del abdomen, fecundando un ovocito proveniente del ovario cuya trompa está ocluida. Existen trabajos que hablarían de un aumento del riesgo de hasta 11 veces mayor en pacientes con una trompa ocluida, siendo esta asociación menor en el caso de ambas trompas ocluidas (Moini *et al* 2014).

Salpingitis crónica

Este factor está presente hasta en el 90% de las gestaciones ectópicas, debido a la alteración histológica de la trompa y posiblemente a la alteración en el transporte del embrión hacia la cavidad endometrial (Kutluay *et al* 1994).

Salpingitis ístmica nodosa

La salpingitis ístmica nodosa está presente hasta en el 10% de las pacientes con embarazo ectópico, y sobretodo está relacionada con los casos de gestación ectópica recurrente. Se trata de una condición en la que se produciría un engrosamiento nodular no inflamatorio de la pared de la trompa de Falopio en la que el epitelio tubárico se introduciría en el miosálpinx, con una hipertrofia de las capas circundantes, produciéndose un divertículo. Su origen es todavía desconocido pero se ha postulado que podría ser debido a un proceso de características similares a la adenomiosis, de tal manera que se produciría una alteración anatómica de la pared tubárica que predispondría a la implantación anómala del embrión (Kurtoglu *et al* 2015).

Exposición intraútero a dietilestilbestrol

El dietilestilbestrol es una forma sintética de estrógenos. Se pautaba a mujeres embarazadas para prevenir abortos espontáneos, partos prematuros y otras complicaciones relacionadas con la gestación (Professional and Public Relations Committee of the DESAD, 1976). Su uso disminuyó cuando determinados estudios demostraron que no era un fármaco adecuado para estos problemas. La exposición intraútero a esta sustancia supone un incremento de 9 veces el riesgo de sufrir un embarazo ectópico, debido a la alteración anatómica y/o funcional de la trompa de Falopio (Goldberg *et al* 1999).

Enfermedad inflamatoria pélvica

La infección pélvica puede provocar una alteración funcional (a nivel celular y molecular), así como obstrucción tubárica, hidrosálpinx y adherencias pélvicas. Algunos autores afirman que la infección pélvica recurrente podría aumentar entre 2,1 y 4,5 veces el riesgo de embarazo ectópico (Hillis *et al* 1997). Se ha observado que ese aumento del riesgo está todavía más relacionado en los casos en los que el germen implicado es la Chlamydia Trachomatis (Bjartling *et al* 2007). Este patógeno es responsable de situaciones como endocervicitis, endometritis y salpingitis, de las que se derivan secuelas potencialmente graves como infertilidad, embarazo ectópico, dolor pélvico y enfermedades inflamatorias pélvicas recurrentes (Mania-Pramanik *et al* 2012).

Edad de inicio de las relaciones sexuales temprana

Una edad de inicio de las relaciones sexuales temprana supone un aumento del riesgo de sufrir un embarazo ectópico, entre otras cosas, por el aumento en la posibilidad de haber tenido

múltiples parejas sexuales (Pisarska *et al* 1999) y con ello un aumento de la probabilidad de sufrir o haber sufrido una infección del tracto genital.

Dispositivos intrauterinos (DIU)

Aunque, por tratarse de un método anticonceptivo, el riesgo de presentar gestación (así como gestación ectópica) es menor en mujeres con DIU que en mujeres que no emplean método anticonceptivo, en caso de gestar, las mujeres con DIU presentan mayor riesgo que se trate de una gestación ectópica (Furlong *et al* 2002). Otros métodos anticonceptivos, como es la anticoncepción de emergencia con progestágenos, también ha sido relacionada con el embarazo ectópico (Sivalingam *et al* 2011).

Factores hormonales

Determinadas hormonas, como los estrógenos y la progesterona, están implicadas en los procesos de crecimiento, diferenciación y funciones de las trompas de Falopio, por lo que una alteración en sus concentraciones podría suponer un aumento del riesgo de implantación anormal, cosa que concuerda con el hecho que determinadas situaciones de cambio hormonal, como la inducción de la ovulación, estén relacionadas con un incremento del riesgo de gestación ectópica (Lavy *et al* 1987).

Ahora bien, no está claro de qué forma las alteraciones hormonales afectarían a la función ciliar y muscular de la trompa de Falopio, pues los datos que tenemos son contradictorios; por un lado, algunos autores refieren que un aumento en la concentración de estrógenos, y un descenso en las concentraciones de gestágenos, produciría una disminución en la actividad de la capa muscular de la trompa de Falopio (Pauerstein *et al* 1975), mientras que otros autores refieren que la ciliogénesis y la buena función ciliar sería estrógeno-dependiente, por lo que el efecto antagónico de los estrógenos, como el que llevan a cabo los gestágenos, causaría una alteración de la función ciliar y la ciliogénesis (Jansen *et al* 1984).

Algunos autores han postulado que concentraciones altas de progestágenos podrían aumentar el riesgo de gestación ectópica, debido a una disfunción de los cilios de la trompa de Falopio (Paltieli *et al* 2000), por lo que situaciones de exposición a gestágenos, como por ejemplo aquellas usuarias de anticonceptivos con sólo gestágenos o el fallo de anticoncepción del DIU liberador de levonorgestrel podrían tener un aumento en el riesgo de padecer un embarazo ectópico.

Tabaquismo

Algunos autores afirman que hasta un tercio de los casos de embarazo ectópico están asociados al tabaquismo (Sivalingam *et al* 2011). Está ampliamente demostrado por diversos trabajos que el tabaquismo en periodo periconcepcional incrementa el riesgo de embarazo ectópico, siendo, además, dosis dependiente (OR 3,9 con más de 20 cigarrillos al día (Shaw *et al* 2010)), debido a mecanismos no del todo conocidos; la alteración de la inmunidad, de la motilidad ciliar y/o uterina, la ovulación retrasada o alteraciones en la expresión génica de la trompa de Falopio podrían ser los responsables de dicho aumento del riesgo (Sivalingam *et al* 2011, Horne *et al* 2014).

Técnicas de reproducción asistida

La fecundación in vitro ha sido relacionada con un aumento de riesgo de sufrir embarazo ectópico (Nazari *et al* 1993, Strandell *et al* 1999), con un riesgo de gestación ectópica del 2-5%, siendo mayor en presencia de patología tubárica (Sivalingam *et al* 2011). La hiperestimulación ovárica, según algunos autores, podría también jugar un papel fundamental en las pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida, debido al ambiente producido por el alto nivel estrogénico (Moini *et al* 2014).

Historia de infertilidad

El aumento de riesgo de embarazo ectópico de las pacientes con historia de infertilidad podría estar relacionado con patología tubárica subyacente en estas pacientes, incluyéndose entre ellas la endometriosis (enfermedad la cual está documentado estar relacionada con la infertilidad per se así como con la distorsión anatómica tubárica); se ha observado este incremento del riesgo en pacientes con infertilidad incluso en ausencia de patología tubárica demostrable (Sivalingam *et al* 2011). También se ha relacionado con los tratamientos empleados en pacientes con infertilidad, ya que los cambios hormonales que se producirían en las trompas podrían conllevar un aumento de riesgo para embarazo ectópico, según algunos autores, hasta dos veces mayor en pacientes que usaron clomifeno (McBain *et al* 1980, Gemzell *et al* 1982, Cohen *et al* 1986).

1.2.6 Manifestaciones clínicas del embarazo ectópico

En cuanto a las manifestaciones clínicas del embarazo ectópico, son escasas y poco

características, y en ocasiones se solapan con otras patologías de la gestación más frecuentes, como es el caso de los abortos. Habitualmente la clínica suele iniciarse entre las 6 y 8 semanas de amenorrea, aunque dependiendo de la localización de la gestación ectópica, este dato puede variar.

La triada clínica clásica de la gestación ectópica es el dolor abdominal asociado a sangrado vaginal en paciente con amenorrea (Ankum *et al* 1996), siendo el dolor abdominal la forma de presentación más frecuente, ya que está presente en el 99% de los casos, seguido de la amenorrea (74% de los casos) y el sangrado vaginal (56% de los casos) (Alsuleiman *et al* 1982). Algunos autores, además, describen algunos signos y síntomas que indicarían mayor riesgo de rotura de la gestación, como son: historia de daño tubárico y/o infertilidad, β hCG mayor de 10000 UI/L, no utilización de anticonceptivos a lo largo de la vida e inducción de la ovulación; según estos autores, el riesgo de rotura en estas pacientes sería del 18% (Weckstein *et al* 1985).

1.2.7 Diagnóstico clásico

Métodos convencionales: exploración física, ecografía transvaginal y β hCG

En el momento actual el diagnóstico de embarazo ectópico se basa en la historia clínica, la clínica y la exploración física, junto con determinaciones hormonales seriadas (β hCG) y la ecografía transvaginal (González Manzanilla *et al* 2005, Bajo Arenas *et al* 2007, Menon *et al* 2007, Ovejero *et al* 2011) (figura 7). La sensibilidad del uso de ambas pruebas combinadas para el diagnóstico de embarazo ectópico es del 96%; la especificidad es del 97%, y el valor predictivo positivo es del 95% (Bajo Arenas *et al* 2007).



Figura 7. Imagen ecográfica de gestación ectópica izquierda en paciente con amenorrea de 6+4 semanas

Problemas asociados: Cuando la gestación no es visible con ecografía, siendo imposible distinguir mediante imagen un embarazo intrauterino evolutivo de curso normal de un aborto o un embarazo ectópico, se plantea un desafío clínico de gran importancia, pues hasta la fecha no existe validada ninguna otra prueba diagnóstica no invasiva definitiva aparte de la determinación de β hCG y la ecografía. La determinación de la β hCG tiene utilidad limitada; no es diagnóstica por sí misma y necesita siempre de la ecografía para ayudar al diagnóstico. La tasa mínima esperada de aumento en sus niveles en 48 horas en un embarazo normal varía entre el 35% y el 66% (Cartwright *et al* 2009). Además, se produce un solapamiento considerable de los valores entre embarazos normales y anormales, necesitando determinaciones seriadas y unos valores analíticos relativamente elevados para poder realizar un diagnóstico, por lo que dichos valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo se obtendrían a costa de un diagnóstico tardío, con las consecuencias de posible ruptura, hemorragia y muerte que esto conllevaría. Por otro lado, la ecografía transvaginal no es concluyente en más del 18% de las pacientes, y menos del 50% de los embarazos ectópicos serían diagnosticados mediante una evaluación inicial (Horne *et al* 2008). Algunos autores afirman que hasta el 16,8% de los embarazos ectópicos y el 7,7% de los embarazos intrauterinos estarían mal clasificados utilizando únicamente niveles seriados de β hCG (Morse *et al* 2012). Estas pacientes, tal y como hemos mencionado, requieren con frecuencia múltiples visitas clínicas (3 visitas de media) antes de poder dar un diagnóstico definitivo (Dart *et al* 2002), llegándose incluso a que el 67% de los embarazos ectópicos sean dados de alta sin un adecuado seguimiento. En ocasiones, en ausencia de hallazgos quirúrgicos, histopatológicos o ecográficos definitivos, puede ser imposible diferenciar entre un embarazo ectópico y una gestación intrauterina temprana de mal pronóstico.

1.2.8 Otros métodos diagnósticos

Biopsia endometrial

En determinados casos, como es la gestación de localización desconocida, se podría realizar una biopsia endometrial para determinar la presencia o no de vellosidades coriales. Su ausencia junto con β hCG estable sería sugestiva de gestación ectópica. De la misma manera, con la práctica de un legrado podría ser de utilidad para el diagnóstico de embarazo intrauterino versus gestación ectópica (Sivalingam *et al* 2011).

Problemas asociados: La biopsia endometrial y el legrado son técnicas invasivas, con complicaciones considerables (endometritis, perforación uterina y sangrado) que presentarían el

riesgo de interrumpir un embarazo intrauterino en curso en etapas iniciales, por lo que no es posible generalizar su empleo para el diagnóstico de embarazo ectópico.

Progesterona

En el intento de conseguir un diagnóstico certero y precoz de embarazo ectópico, se han estudiado otros marcadores, como la progesterona, las activinas, la proteína A plasmática asociada al embarazo, el lactógeno placentario humano, marcadores de trofoblasto anómalo, de funcionamiento del cuerpo lúteo, marcadores endometriales (glicodelina, activina B), de implantación anómala, de daño celular y muscular de la trompa de Falopio (por ejemplo, mucina 1) (Savaris *et al* 2008, Al-Azemi *et al* 2009), marcadores inflamatorios, etc. Es más, dadas las posibles consecuencias de un falso positivo o negativo, se ha intentado conseguir la mayor especificidad y sensibilidad posibles, realizándose combinaciones de varios marcadores, con el fin de maximizar la sensibilidad y especificidad de los distintos biomarcadores propuestos.

La progesterona es producida durante las primeras semanas del embarazo por el cuerpo lúteo y a partir de la 8ª semana de gestación por la placenta, tratándose de una hormona de vital importancia para el desarrollo de una gestación normal (Arck *et al* 2007).

Problemas asociados: Las concentraciones séricas de progesterona están disminuidas en embarazos ectópicos y abortos. Ahora bien, algunos estudios determinan que el valor predictivo de una concentración de progesterona sérica es bajo para identificar gestaciones no viables (Mol *et al* 1998, Seeber *et al* 2006). Las cifras séricas de progesterona asociadas a embarazos intrauterinos normales, anormales iniciales y a gestaciones ectópicas varían notablemente y presentan solapamiento. Parece que cifras mayores de 20 ng/ml podrían indicar un embarazo intrauterino normal, mientras que cifras inferiores a 5 ng/ml casi siempre indicarían una gestación no viable. Ahora bien, el 50% de los embarazos ectópicos, el 20% de los abortos espontáneos y alrededor del 70% de los embarazos intrauterinos viables se asocian a cifras séricas de progesterona entre 5 y 20 ng/ml (Condous *et al* 2004). Por otra parte, algunos autores afirman que hasta un 2,6% de pacientes con embarazo ectópico podrían presentar una progesterona sérica mayor de 20 ng/ml, no suponiendo este valor alto de progesterona, una herramienta de descarte definitiva de embarazo ectópico (Mol *et al* 1998). La sensibilidad y especificidad de la progesterona para identificar un embarazo ectópico es de 88% y 40%, respectivamente: parece sensible y específica para identificar el embarazo anormal, pero sólo moderadamente específica para la identificación de un embarazo ectópico. Por este motivo, como también ocurre con la determinación de la β hCG sérica, las pacientes requieren con

frecuencia múltiples visitas clínicas antes de un diagnóstico definitivo (Dart *et al* 2002).

1.2.9 Últimas investigaciones. Estado actual del tema

En un intento de mejora en precisión y rapidez en el diagnóstico de la gestación ectópica, diversas moléculas han sido estudiadas, y aunque todavía algunas de ellas están en fase de experimentación o siendo sometidas a estudios de coste-beneficio (y por tanto no son utilizadas actualmente en la práctica clínica diaria), podría resultar de gran interés conocer y entender el posible papel de estas moléculas en la etiopatogenia de la gestación ectópica, pudiendo también tener gran interés como herramienta diagnóstica entre gestación intrauterina evolutiva o no y la gestación de localización ectópica.

Así, se ha observado un funcionamiento anómalo del cuerpo lúteo en pacientes con embarazo ectópico, teniendo lugar una producción alterada de progesterona, relaxina, estradiol, e inhibina A (Rausch *et al* 2012); por otro lado, marcadores como progesterona, PAPP-A, lactógeno placentario humano y glicodelina (Daponte *et al* 2005) así como algunos marcadores relacionados con la destrucción tubular (por ejemplo, miosina y mioglobina) no han demostrado ser de utilidad para el diagnóstico y pronóstico del embarazo ectópico (Birkhahn *et al* 2001). La creatinkinasa se ha observado elevada en pacientes con rotura tubárica; ahora bien, se trata de un marcador inespecífico y tardío que tampoco ha demostrado ser de utilidad (Rausch *et al* 2012). La interleukina 8, el factor de necrosis tumoral alfa, la interleukina 6 o el Ca125 no han mostrado tampoco utilidad por tratarse de marcadores de inflamación e irritación peritoneal inespecíficos (Rausch *et al* 2012).

En la **Tabla 1** se resumen las principales moléculas que se han estudiado de manera más robusta hasta la fecha como posibles candidatas a biomarcadores de gestación ectópica.

Molécula	Función	Niveles en EE	Limitaciones	Referencia
Activina A	Factor de crecimiento (familia TGF- β) Desarrollo embrionario inicial: organogénesis, apoptosis, remodelación...	Disminuidos	Poca especificidad Poca utilidad en gestación de localización desconocida	Florio <i>et al</i> 2007 Kirk <i>et al</i> 2009 Refaat <i>et al</i> 2014
Factor de crecimiento endotelial	Neoangiogénesis	Aumentados	Niveles de discriminación confusos	Rausch <i>et al</i> 2012
ADAM-12	Desintegrina. Metaloproteasa	Disminuidos	Poca especificidad Alterado también en gestaciones evolutivas como trisomía 21	Laigaard <i>et al</i> 2006 Rausch <i>et al</i> 2012 Tørring <i>et al</i> 2010
Ratio PIGF/sFlt-1	Factor angiogénico y receptor VEGF Vascularización del lugar de implantación	Disminuidas	Test combinado: necesidad de dos marcadores	Plaisier <i>et al</i> 2007 Plaisier <i>et al</i> 2009 Daponte <i>et al</i> 2011
Ratio hCGRP/i:hCG en orina	Producto del trofoblasto Aumenta síntesis de progesterona Mantenimiento del cuerpo amarillo	Disminuidas	Baja especificidad y baja sensibilidad	Lee <i>et al</i> 2005 Teixeira <i>et al</i> 2014

Tabla 1. Principales moléculas estudiadas como posibles herramientas diagnósticas en el embarazo ectópico y sus funciones, niveles detectados en el embarazo ectópico y limitaciones en su empleo como herramienta diagnóstica

1.2.10 Evolución y manejo del embarazo ectópico

El embarazo ectópico puede resolverse espontáneamente, pero puede también crecer y provocar la rotura de la trompa, ya que ésta no está preparada para la implantación y crecimiento del embrión, con la consiguiente morbimortalidad que conlleva, no existiendo marcadores clínicos, ecográficos o moleculares que nos puedan ayudar a prever la posible rotura de dicho embarazo ectópico.

En lo que al manejo se refiere, puede ser quirúrgico, médico o bien expectante (Sivalingam *et al* 2011), dependiendo de algunos criterios, y debiendo individualizar siempre los casos. Ya sea expectante, quirúrgico o médico, es importante que el tratamiento sea instaurado precozmente con el fin de reducir la morbimortalidad materna. El retraso en el diagnóstico de embarazo ectópico elimina la posibilidad de un manejo conservador, dada la posibilidad de ruptura y riesgo materno, por lo que resultaría de gran importancia conocer y entender mejor qué mecanismos moleculares pueden estar implicados en esta patología y si dichos mecanismos alterados podrían ofrecer biomarcadores que nos ayudasen a un diagnóstico precoz.

Manejo quirúrgico

En cuanto al manejo quirúrgico, la laparoscopia es el método de elección en el caso de pacientes hemodinámicamente estables, siendo de elección la salpingectomía a la salpingostomía (Sivalingam *et al* 2011), si bien existen trabajos que afirman no existir un aumento del riesgo de embarazo ectópico posterior tras salpingostomía, pero sí parece existir un aumento del riesgo de sangrado postquirúrgico y reintervenciones y tratamiento médico por persistencia de trofoblasto (Nama *et al* 2009).

Manejo médico

En lo que al tratamiento médico se refiere, éste sería útil en casos de gestación ectópica que cumplan determinados criterios, como gestación no rota, pacientes hemodinámicamente estables y en ausencia de sintomatología, con poco líquido libre en la ecografía transvaginal, β hCG menor de 3000 IU/l, tamaño de la gestación menor de 4 centímetros, y ausencia de frecuencia cardiaca fetal (Sivalingam *et al* 2011). El fármaco de elección para el tratamiento médico del embarazo ectópico es el metotrexato intramuscular. Es un antagonista del ácido fólico, deteniendo la mitosis en las células citotrofoblásticas del embarazo. Ahora bien, se trata

de una medicación con efectos secundarios que aunque infrecuentes son importantes, tales como hepatotoxicidad, alopecia o toxicidad de médula ósea. Dichas pacientes precisarán por tanto un seguimiento exhaustivo para asegurar la resolución completa del embarazo ectópico así como el no desarrollo de las complicaciones asociadas (Lipscomb *et al* 1998, Lipscomb *et al* 1999, Sowter *et al* 2001, Barnhart *et al* 2003). Además, el metotrexato, según algunos autores, solo presentaría una tasa de éxito del 88% en dosis simples únicamente para los embarazos ectópicos estables (Horne *et al* 2008).

Por otro lado, la conducta expectante es una estrategia conservadora en la que se evalúa si la gestación se resuelve espontáneamente sin intervención. Se debe tratar, obviamente, de una gestación ectópica con pocos factores de riesgo y buen pronóstico, si bien se trata de una conducta con gran riesgo de rotura y muerte materna, requiriendo además gran número de visitas clínicas y determinaciones analíticas seriadas (Condous *et al* 2006).

Si se pudiera realizar en una única visita el diagnóstico certero y precoz de embarazo ectópico, sería posible dirigir los recursos y esfuerzos a aquellas mujeres con alto riesgo de embarazo ectópico sin comprometer la seguridad de las mismas (Condous *et al* 2005), evitando visitas y tratamientos innecesarios, al mismo tiempo que evitaríamos situaciones de riesgo. A menos que el embarazo ectópico sea visible mediante ecografía, su diagnóstico precoz puede ser un reto; este reto puede ser mayor a la hora de diferenciar si se trata de un embarazo intrauterino viable, un aborto o un ectópico, sobre todo si pretendemos realizar este diagnóstico con una única visita. Es por ello que comprender adecuadamente qué mecanismos están implicados en el origen y desarrollo de la gestación ectópica podría facilitar la búsqueda de un marcador de embarazo ectópico precoz y certero, no solo útil como herramienta diagnóstica y pronóstica, sino también terapéutica, pudiendo permitirnos actuar a nivel molecular en este proceso desregulado.

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Definición

Los microRNAs son pequeños fragmentos de RNA (de 18 a 25 nucleótidos) cuya función no es codificar proteínas, sino la regulación postranscripcional de multitud de genes diana (Petraglia *et al* 1997), que se encuentran por todo el genoma. También tienen función controlando la expresión de dicho genoma, en la transcripción y traducción de RNAs

codificantes de proteínas (Zhang *et al* 2007). Aunque algunos microRNAs se expresan de manera ubicua en los mamíferos, otros tienen un patrón de expresión muy específica.

1.3.2 Mecanismo de acción y funciones

El principal mecanismo de regulación por microRNAs está mediado por su capacidad de unión (por homología parcial) a secuencias complementarias de distintos RNAs diana, provocando silenciamiento génico a nivel postranscripcional, pudiendo suprimir la traducción o degradando la molécula de RNA mensajero. Se ha descrito también que la acción de los microRNAs pueda asociarse al aumento de la expresión de genes diana, indicando que los mecanismos por los cuales actúan los microRNAs son todavía más complicados de lo que se había pensado (Luo *et al* 2009). Además, la mayoría microRNAs no son complementarios a un mRNA específico, regulando de esta forma simultáneamente más de un gen; por otro lado, diferentes microRNAs pueden ejercer regulación sobre la misma diana, ejerciendo incluso funciones biológicas similares, amplificando de esta manera sus acciones (Bueno *et al* 2008, Morales Prieto *et al* 2011). Los diferentes patrones de expresión de los microRNAs están asociados con determinados fenotipos expresados por las distintas células, tejidos, órganos, etc (Luo *et al* 2009).

Los microRNAs son transcritos a partir de DNA, dando una molécula llamada pre-microRNAs, que es procesada por el complejo nuclear enzimático Drosha para formar moléculas de pre-microRNAs, que son transportadas al citoplasma a través del complejo Exportin-5. Una vez en el citoplasma, las moléculas pre-microRNAs son escindidas por Dicer, una enzima de la superfamilia RNasa III, para formar cadenas simples de microRNAs maduros (ver figura 9). Por último, los microRNAs maduros se asocian con el complejo RISC, reprimiendo la traducción de proteínas (Cheng *et al* 2005, Bueno *et al* 2008, Qavi *et al* 2010). Los microRNAs se unen a las regiones 3'UTR del mRNA, y, bloquean, tal y como ya hemos mencionado, la traducción o provocan la degradación del mensaje a través de RISC (Haider *et al* 2014).

1.3.3 MicroRNAs como biomarcadores de patología

Diversos estudios de expresión y funcionales han documentado la implicación de multitud de microRNAs en la regulación de procesos biológicos que incluyen mecanismos tanto fisiológicos como patológicos: proliferación y metabolismo celular, apoptosis, hematopoyesis,

transformación tumoral... pero el análisis de la implicación de estas moléculas en procesos como la gestación es sólo incipiente (Zhang *et al* 2007).

Un aspecto importante es que los microRNAs, además de encontrarse a nivel citoplásmico y nuclear, se encuentran en otros compartimentos celulares y no celulares, como las mitocondrias, el suero sanguíneo, microvesículas y exosomas (Haider *et al* 2014); en este sentido, los microRNAs se liberan extracelularmente a la circulación a través de exosomas, por lo que sería posible detectar sus niveles de expresión en el torrente sanguíneo (Luo *et al* 2009). Los exosomas son originados a partir de vesículas intraluminales presentes en múltiples órganos, secretadas por las células hematopoyéticas, siendo, los RNA secretados a través de exosomas, transferibles a otras células (Van Niel *et al* 2006).

Así, diversos autores han visto la relación y la utilidad diagnóstica entre microRNAs y patologías como la enfermedad coronaria, neuroblastoma, diabetes mellitus, cáncer de mama, y cáncer colorrectal (Zhou *et al* 2015, Clancy *et al* 2015).

En lo que a embarazo se refiere, dado que algunos microRNAs cambiarían sus patrones de expresión entre gestantes y no gestantes, y entre gestaciones normales y patológicas, y dado que son enormemente estables y que es posible detectarlos mediante técnicas convencionales en tejido y en el torrente materno (como stem-loop RT-PCR y arrays), estas moléculas nos harían comprender multitud de mecanismos implicados en diversas patologías de la gestación, así como ofrecernos potenciales biomarcadores de patología y quizá dianas terapéuticas.

1.3.4 MicroRNAs y placenta

Estudios preliminares de perfiles de expresión de microRNAs en diversos tejidos humanos por microarrays han identificado conjuntos de microRNAs selectivamente expresados en tejido placentario; entre otros, microRNAs como miR-23, miR-136, miR-141, miR-224, miR-512, miR-515, miR-516, miRNA-517, miR-518, miR-519, miR-520, miR-524, miR-525 y miR-526, estando implicado en la mayoría de estos microRNAs el cromosoma 19, donde C19MC representa el mayor cluster de microRNA (Barad *et al* 2004, Liang *et al* 2007, Morales-Prieto *et al* 2011).

Así, se ha observado también que el nivel de C19MC en células trofoblásticas aumenta significativamente entre el primer y el tercer trimestre; los niveles C14MC disminuyen en el mismo periodo de tiempo (Morales-Prieto *et al* 2011), mientras que los niveles de miR-378a-5p

se han encontrado mayores en primer y segundo trimestre que en tercer trimestre (Luo *et al* 2012). Por tanto, algunos autores afirman que algunos microRNAs placentarios podrían tener utilidad en la estimación de las condiciones de la placenta, estando probablemente relacionados con la diferenciación de la misma y el mantenimiento de la gestación (Miura *et al* 2010).

1.3.5 MicroRNAs e implantación

Otros autores han demostrado el papel de los microRNAs en la implantación y su potencial papel diagnóstico en el deterioro de la receptividad endometrial, el desarrollo anormal del embrión, el fracaso de la implantación en reproducción asistida así como en la gestación de localización desconocida (Galliano *et al* 2014).

Así, aunque se han conseguido multitud de avances, el conocimiento que tenemos acerca de los posibles mecanismos implicados en la implantación, tanto en condiciones normales como en el fracaso de la misma o la implantación anómala, es todavía muy limitado. Es por ello que entender cuál es la implicación de los microRNAs en la regulación de la expresión génica en el sistema reproductor nos ayudaría a comprender dónde está el problema en determinadas situaciones clínicas y a aplicar el manejo más apropiado en cada una de ellas, para conseguir una relación perfecta entre un embrión biológicamente viable y un endometrio receptivo, para el éxito de la reproducción.

De esta manera, según Galliano *et al* 2014, los microRNAs tendrían un papel fundamental y estarían implicados en procesos como embriones no viables, fallo de implantación, embarazo ectópico y gestación de localización desconocida, y lo que todavía sería más interesante, podrían utilizarse como biomarcadores no invasivos de determinadas patologías o indicadores pronósticos.

Un ejemplo de esto es lo que han demostrado Rosenbluth *et al* en su estudio publicado en 2013, en el que comparan la expresión de microRNAs en embriones euploides así como aneuploides, observándose que algunos microRNAs como el miR-27b, miR-141, miR-345 y miR-339-3p presentan perfiles de expresión distintos según se trate de embriones cromosómicamente normales o aneuploides, pudiendo emplearse este hallazgo como herramienta en lo que a pronóstico embrionario en fases tempranas de la gestación se refiere, o para el diagnóstico previo a la transferencia embrionaria, transfiriendo únicamente aquellos embriones euploides.

Por otro lado, alteraciones en la invasión trofoblástica durante el proceso de implantación son posibles razones por las que puede producirse un fracaso en reproducción asistida (Galliano *et al* 2014).

La figura 8 muestra los posibles mecanismos de estricta regulación por los que los microRNAs potencialmente estarían implicados en el proceso de implantación, actuando tanto a nivel embrionario como a nivel endometrial.

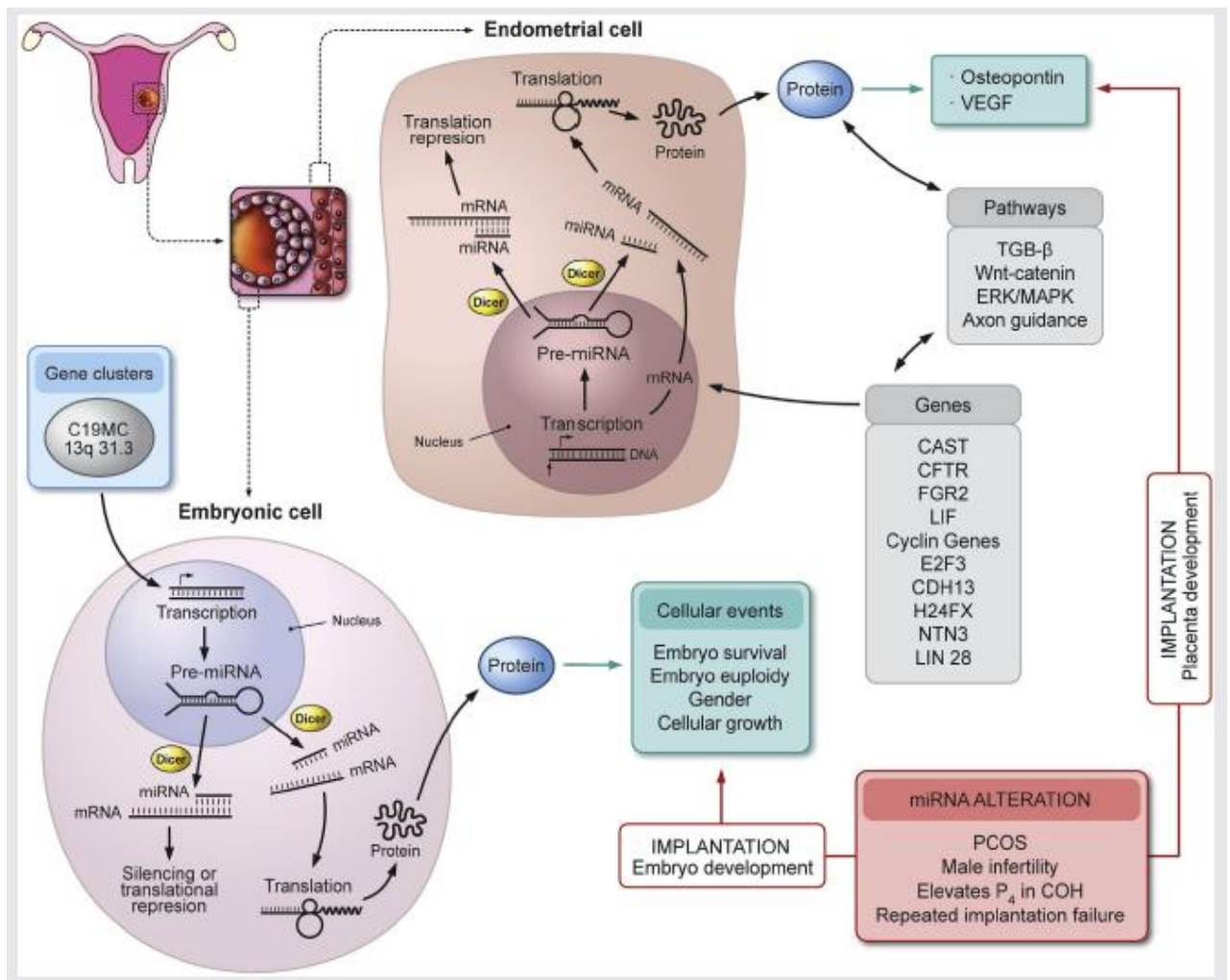


Figura 8. Mecanismos de regulación de los microRNAs en el proceso de implantación. Los microRNAs están implicados tanto a nivel endometrial como a nivel embrionario. Determinados microRNAs sintetizados por el endometrio y/o el embrión regulan vías de señalización implicadas en la implantación embrionaria. Determinadas situaciones clínicas patológicas, como el síndrome de ovario poliquístico, o el fallo de implantación, presentarían patrones de expresión de microRNAs anómalos (tomado de Galliano y colaboradores 2014)

Según Sha *et al* en 2011, determinar la expresión génica de determinados microRNAs podría ayudar a determinar el grado de maduración endometrial durante los ciclos de

estimulación ovárica. Por otro lado, se ha demostrado que durante la implantación el embrión interactúa y regula el endometrio, interviniendo en la expresión y secreción de moléculas como integrinas, interleukina 1, quimiocinas IL-8 (Simón *et al* 1997, De los Santos *et al* 1996), al mismo tiempo que el endometrio secreta algunos fluidos que nutren al embrión, constituyéndose de esta manera un microambiente para un adecuado diálogo entre endometrio y embrión durante el proceso de implantación. En este sentido, algunos autores (Vilella *et al* 2015) defienden que existe un patrón de expresión de microRNAs endometriales diferencial durante la ventana de implantación (periodo de mayor receptividad del endometrio al blastocisto), y que determinados microRNAs, como por ejemplo el Hsa-miR-30d, secretado por el endometrio materno y transportado mediante exosomas, podría actuar sobre el embrión previamente a la implantación y modificar su transcriptoma aumentando la expresión de determinados genes implicados en la adhesión embrionaria al endometrio.

1.3.6 Dicer y complejo RISC

Dicer es una RNAasa tipo III cuyo gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 14 en la región 32.13, que regula la expresión de determinados genes y está implicada en la síntesis y regulación de microRNAs. Contiene una ATPasa/RNA helicasa, un dominio PAZ (Piwi, Argonaute y Zwiille), dos dominios RNAasa III catalíticos, un dominio de función desconocida (DUF283) y C-terminal dsRBD. Esta RNA helicasa actúa escindiendo en el citoplasma las cadenas de RNA precursores en fragmentos más cortos de RNA, los microRNAs. La mutación de Dicer1 puede dar lugar a multitud de procesos patológicos, entre los cuales se ha relacionado el carcinoma de tiroides (Rutter *et al* 2016), tumores de células de Sertoli y Leidig (Wang *et al* 2015), rabdiomiosarcoma embrionario de cérvix, nefroma quístico, blastoma pleuropulmonar... (Faure *et al* 2015, Connerty *et al* 2015).

Una vez procesados por Dicer, los microRNAs maduros se asocian con el complejo RISC, reprimiendo la traducción de proteínas (Cheng *et al* 2005, Bueno *et al* 2008, Qavi *et al* 2010). Los microRNAs se unen a las regiones 3'UTR del mRNA, y, bloquean la traducción o provocan la degradación del mensaje a través de RISC (Haider *et al* 2014) (figura 9).

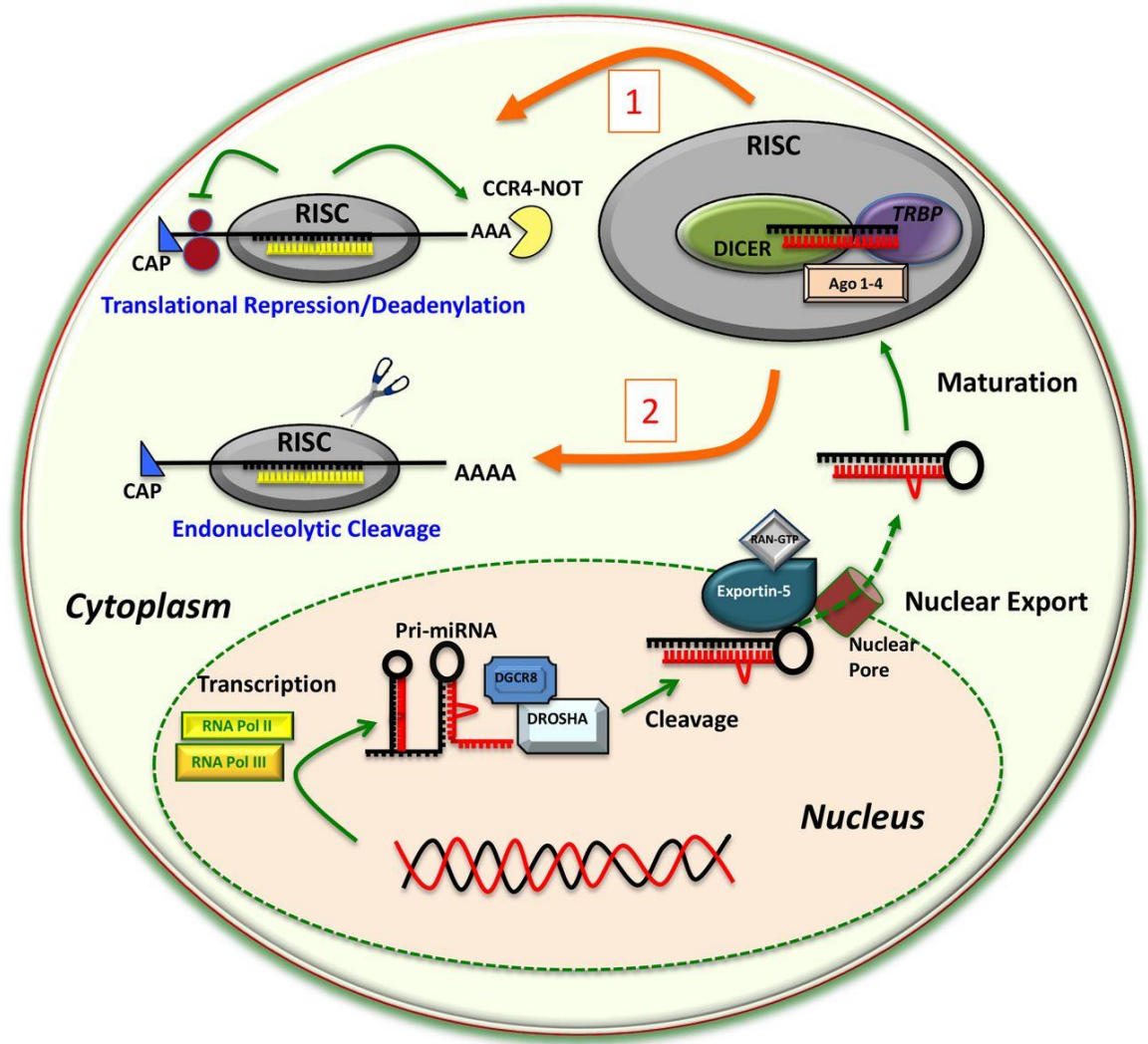


Figura 9. Los microRNAs maduros son producidos por procesamiento a partir de precursores (pri-miRNAs), que son transformados por acción del complejo nuclear Drosha en pre-miRNA (≈ 70 nt), que tras su exportación al citoplasma son a su vez convertidos en microRNAs maduros por acción secuencial del complejo enzimático Dicer y miRISC (tomado de Swaminathan y colaboradores 2013)

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

La placentación es un proceso fundamental en el éxito de la reproducción, sometido a una estrecha regulación donde el **trofoblasto** juega una función clave. Este proceso se realiza adecuadamente gracias a la relación estrictamente regulada entre los tejidos materno-fetales, donde intervienen multitud de moléculas y receptores; por tanto es necesario un correcto desarrollo de dicho proceso para asegurar una gestación a término saludable, y la invasión anómala del trofoblasto conducirá a un gran abanico de complicaciones, entre ellas el embarazo ectópico.

El proceso de placentación está alterado en las gestaciones ectópicas, produciéndose la implantación fuera de la cavidad endometrial. Las alteraciones en este proceso pueden ser origen o debidas a la aparición de diferentes marcadores tisulares con distintos patrones de expresión en las gestaciones ectópicas, a diferencia de las gestaciones evolutivas, que podrían modificar las vías fundamentales que intervienen en la regulación del proceso y la correcta placentación e implantación. Por otro lado, los **microRNAs** son moléculas con gran capacidad reguladora de múltiples dianas y multitud de procesos biológicos; además, algunos estudios preliminares de perfiles de expresión de microRNAs en tejido humano mediante microarrays identifican microRNAs selectivamente expresados en tejido placentario.

Nuestra hipótesis por tanto plantearía que, dado que existen distintos mecanismos que jugarían un papel en el proceso de regulación de la placentación de los embarazos ectópicos respecto de gestaciones normales evolutivas, existiría un patrón de expresión de microRNAs diferencial entre ambas gestaciones, con lo que el análisis de tal perfil de expresión en ambos tipos de embarazo en las mismas etapas de la gestación podría proporcionarnos nuevos conocimientos y ayudarnos a conocer los mecanismos implicados en la fisiopatología de la gestación ectópica en el ser humano.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

- Identificar el perfil global de expresión de microRNAs en tejido embrionario trofoblástico procedente de gestaciones ectópicas tubáricas y de gestaciones evolutivas sanas con interrupción voluntaria del embarazo en el primer trimestre de la gestación.
- Validación de dichos perfiles de expresión diferenciales mediante PCR en tiempo real.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar las posibles dianas de los microRNAs identificados en la fisiología de la gestación.
- Definir algunos mecanismos moleculares y vías de señalización mediados por microRNAs que podrían ser distintas en embarazos ectópicos comparado con gestaciones intrauterinas normales y estar implicados en su etiopatogenia.
- Estudio *in vitro* de la transfección de los microRNAs identificados en líneas celulares trofoblásticas y su posible alteración en la expresión génica de los potenciales genes diana.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

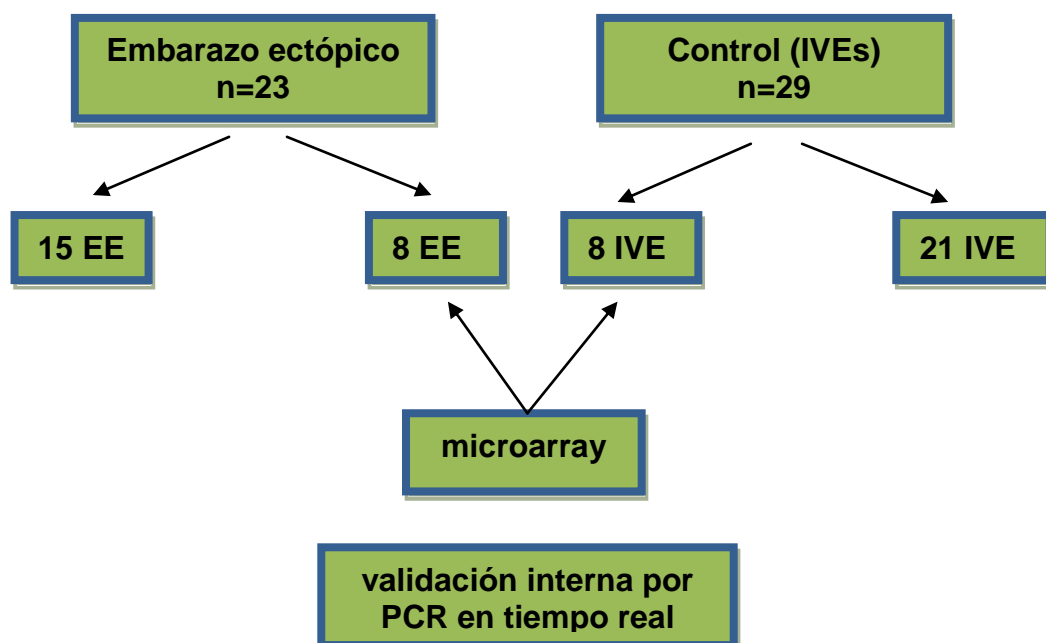
4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Aprobación ética

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Institucional del Hospital Universitario La Fe, Valencia, España (2012/0340). El tejido embrionario (fundamentalmente trofoblasto) fue recogido tras obtener el consentimiento informado por escrito de cada paciente para este estudio, bajo los principios de la Declaración de Helsinki para la investigación médica en seres humanos.

4.2 Diseño del estudio

Veintitrés pacientes con embarazo ectópico (EE) y veintinueve pacientes del grupo control (IVEs) fueron reclutadas para el estudio. El diseño del estudio incluyó una primera serie de ocho pacientes con EE tubárico y ocho pacientes con interrupción voluntaria del embarazo para la búsqueda de microRNAs candidatos en el estudio de microarrays. Para validar los microRNAs expresados significativamente encontrados mediante microarray se utilizó PCR en tiempo real tanto en las muestras usadas para el microarray como en una segunda serie de muestras de quince pacientes con EE y veintiún pacientes con IVE. Las características de las pacientes incluidas en ambas series se describen en las **Tablas 2 y 3** respectivamente.



	Edad	Semanas de amenorrea	Gravidez	Nº de partos	Hª de abortos espontáneos o IVEs	Nº de abortos	Hª de EE anterior	Hª de cirugía abdominal o pélvica	Hª de infertilidad	DIU o anticoncepción con progestágenos
EE	30,7 ± 1,7	7+1	3,3 ± 0,9	0,5	4 (50%)	1,7	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0	0
IVE	26 ± 3,1	7+6	2,1 ± 0,2	0,5	3 (37,5%)	0	1 (12,5%)	0	1 (12,5%)	2 (25%)
Valor de p	ns	0,03	ns	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Características de las pacientes de las muestras estudiadas para los arrays. Los datos se muestran como la media ± el error estándar de la media, o como número y su porcentaje; ns: no significativo. Semanas de amenorrea (en semanas + días), gravidez, el número de partos, historia previa de abortos espontáneos o IVEs y el número de abortos fue evaluado mediante el test U de Mann-Whitney, mientras que la historia previa de embarazo ectópico, la historia previa de cirugía abdominal o pélvica, la infertilidad y la utilización de DIU o anticonceptivos fue evaluado mediante el test exacto de Fisher

	Edad	Semanas de amenorrea	Gravidez	Nº de partos	Hª de abortos espontáneos o IVEs	Nº de abortos	Hª de EE anterior	Hª de cirugía abdominal o pélvica	Hª de infertilidad	DIU o anticoncepción con progestágenos
EE	30,8 ± 1,5	6+6	2,1 ± 0,3	0,3	7 (43,7%)	0,8	1 (6,2%)	4 (25%)	3 (18%)	0
IVE	24,6 ± 1,8	7+4	2,1 ± 0,3	0,4	5 (23,8%)	0,2	1 (4%)	4 (19%)	0	15 (75%)
Valor de p	0,002	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Características de las pacientes de las muestras estudiadas con PCR en tiempo real. Los datos se muestran como la media ± el error estándar de la media, o como número y su porcentaje; ns: no significativo. Las semanas de amenorrea (en semanas + días), gravidez, el número de partos, historia previa de abortos espontáneos o IVEs y el número de abortos fue evaluado mediante el test U de Mann-Whitney, mientras que la historia previa de embarazo ectópico, la historia previa de cirugía abdominal o pélvica, la infertilidad y la utilización de DIU o anticonceptivos fue evaluado mediante el test exacto de Fisher

4.3 Muestras

Las muestras de las pacientes incluidas en este estudio fueron tomadas tras la firma del consentimiento informado. En todos los casos la gestación fue datada correctamente de acuerdo a la fecha de la última menstruación (semanas de amenorrea). El diagnóstico de EE se basó en la historia clínica y la exploración física, ecografía transvaginal y la determinación de los niveles de β hCG seriada, confirmándose el diagnóstico mediante laparoscopia, procedimiento en el cual se extrajo el tejido. Las pacientes diagnosticadas de EE no recibieron tratamiento con metotrexato previamente a la laparoscopia, por no cumplir criterios o por deseo de la paciente de tratamiento quirúrgico.

La laparoscopia se realizó de la siguiente manera: los EE seleccionados para este estudio fueron gestaciones tubáricas sin signos de rotura, ubicadas en el istmo o la ampolla proximal de la trompa de Falopio. La porción de la trompa que contenía el EE se pinzó a ambos lados del mismo (aproximadamente a 1 centímetro de distancia de la gestación), aplicándose entonces coagulación bipolar y corte con tijera de la zona coagulada. El mesosálpinx adyacente también se coaguló y cortó de igual forma. Posteriormente, se realizó una incisión longitudinal antimesentérica en la superficie de la trompa y se aplicó una presión digital suave para extraer el tejido correspondiente a la gestación. Se separó cuidadosamente el tejido embrionario de los posibles coágulos de sangre o tejido tubárico en el quirófano bajo un estereomicroscopio y se colocaron inmediatamente en el reactivo TRIzol®. Una vez hecho esto, las muestras fueron congeladas y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento y determinación. En todos los casos se envió un fragmento de la muestra al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Fe, que proporcionó la confirmación histológica de EE y la ausencia de tejido tubárico en los fragmentos de los cuales obtuvimos las muestras almacenadas. De la misma manera, en el caso de los IVEs se obtuvo la muestra tras dilatación cervical y evacuación fetal o mediante legrado por aspiración para obtener el tejido embrionario. Se separó la muestra en el quirófano de los posibles coágulos o tejido endometrial y se colocaron inmediatamente en el reactivo TRIzol®, para ser congeladas y almacenadas a -80° hasta ser cuantificadas.

4.4 Extracción del RNA

Todas las muestras de tejido se procesaron para la completa extracción de RNA usando el reactivo TRIzol® siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, CA). Este reactivo, que precisa estar almacenado entre 2°C y 25°C para su correcta conservación, está diseñado para aislar con gran calidad RNA y DNA de tejidos de procedencia humana, animal, vegetal, bacterias o levaduras, en un tiempo estimado de una hora. Se trata de una solución monofásica

de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros elementos que facilitan el aislamiento de diversos RNAs de tamaños moleculares distintos. El mecanismo por el que el TRIzol® mantiene la integridad del RNA es debido a la inhibición con gran eficacia de la RNAasa, al mismo tiempo que destruye otros componentes celulares de la muestra durante la reacción. Además, el reactivo permite el procesamiento simultáneo de una gran cantidad de muestras (Chomczynski 1987), y es capaz de realizar la precipitación secuencial de RNA, DNA y proteínas a partir de una misma muestra de tejido (Chomczynski 1993).

Una vez recogidas las muestras y homogeneizadas con TRIzol®, precisan ser procesadas inmediatamente o congeladas a -80°C hasta ser procesadas y cuantificadas.

En el momento de la extracción, se añade cloroformo, separándose una capa superior transparente que corresponde a la fracción que contiene el RNA, una interfase, y una capa inferior de coloración rojiza, que es la que contiene las proteínas y el DNA. El RNA precipita en la capa acuosa con isopropanol. Se incuba y centrifuga a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, el precipitado se lava para eliminar las impurezas.

La cantidad (ng/ml) y la pureza (260/280 y 260/230 ratio) de los RNAs obtenidos se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific) y la presencia, la proporción, y la calidad de los microRNAs se evaluaron con pequeños RNA LabChips y Bioanalyzer (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5 Microarrays, análisis de componentes principales y clustering

Para comparar los perfiles de microRNAs en tejido embrionario entre muestras IVE y EE, se emplearon microarrays 8x15K v3.0 (Agilent Technologies Inc., DE, EE.UU.) que evalúan la expresión de 866 microRNAs humanos (Ver datos GEO para obtener una lista completa de estos microRNAs, disponible en (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44731>)). El RNA total de cada muestra se amplificó, se identificó y se hibridó de acuerdo con las instrucciones del fabricante Agilent (Altmae *et al* 2013). El protocolo Agilent genera microRNAs fluorescentes de una cantidad de 100 ng de RNA total. Este método implica la unión de moléculas de cianina 3-PCP en los extremos 3' de las moléculas de RNA, con una gran eficiencia (superior al 90%). En primer lugar se lleva a cabo una reacción de defosforilación, con los 100 ng de RNA total, añadiendo fosfatasa alcalina intestinal bovina, e incubando a 37°C durante 30 minutos en agua. A continuación, al RNA defosforilado se añade sulfóxido de dimetilo al 100% a 100°C para desnaturalizar el RNA. Se añaden posteriormente

ligasas de RNA de fago T4 y Cy3-PCP, incubando el preparado durante 2 horas a 16°C, y centrifugándolo en vacío durante 2-3 horas a 45°C. Después, las muestras se resuspenden en agua, se añade un agente de bloqueo y un tampón de hibridación, y se incuban durante 5 minutos a 100°C previamente a ser transferidas a hielo durante 5 minutos. Entonces las muestras se cargan en el microarray y se incuban durante 20 horas a 55°C. Por último, los microarrays se lavaron y fueron escaneados utilizando el escáner GenePix Pro y se analizaron los datos obtenidos para cada sonda. Posteriormente, los valores de intensidad fueron cuartil y logarítmicamente normalizados utilizando el software R y Bioconductor 'limma' y 'tkrplot'. El análisis de componentes principales (PCA) fue utilizado para representar la variación entre muestras en 3D, lo que redujo todos los valores de los microRNAs expresados diferencialmente a tres componentes principales (PC1, PC2 y PC3).

El PCA es un método no supervisado utilizado para determinar la estructura interna de un conjunto de datos sin ninguna información previa sobre el mismo, permitiendo la detección de tendencias en los datos a partir de puntos que se agrupan representando perfiles multivariantes similares, mientras que los puntos distantes representan diferentes descriptores (Domínguez *et al* 2015).

Los valores medios de cada sonda se fusionaron y los datos se reducen a una representación PCA utilizando un script de R y el paquete 'prcomp' (Medina *et al* 2010). Para el análisis estadístico se empleó Software MeV (Chu *et al* 2008). Los datos de los microarrays están disponibles para el acceso público en la base de datos GEO con el número de acceso GSE44731.

4.6 Validación PCR en tiempo real

Los resultados de los microarrays fueron validados por PCR en tiempo real utilizando el kit miScript de transcripción inversa y kits comerciales miScript SYBR Green PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los ensayos de primers específicos para hsa-miR-196b, hsa-miR-223, hsa-mir-30a y hsa-mir-451 fueron adquiridos de Qiagen y se realizó cuantificación PCR en tiempo real en el instrumento LightCycler 480 (Roche) (tabla 4). Para normalizar los valores de expresión, un RNA nuclear con expresión constitutiva, SNORD96A, se utilizó como control housekeeping (Manfè *et al* 2013). Los niveles de expresión fueron cuantitativamente analizados utilizando el método $2\Delta\Delta C_t$ y se normalizaron a controles IVE.

MicroRNA	Primer empleado para amplificar
hsa-miR-196b	5'UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG
hsa-miR-223	5'UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-30a	5'UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-miR-451	5'AAACCGUUACCAUUACUGAGUU

Tabla 4. Primers empleados para amplificar microRNAs en PCR en tiempo real (miscript, QIAGEN)

4.7 Análisis bioinformático de los genes diana y determinación de funciones regulados por los microRNAs seleccionados

Se realizó un análisis informático para identificar genes y vías de señalización que podrían ser moduladas por la expresión alterada de los microRNAs que identificamos. Para el análisis *in silico* utilizamos tres programas de software distintos: la herramienta basada en la web 'DIANA-miRPATH' junto con microRNA.org (Betel *et al* 2010, Vlachos *et al* 2012) para predecir las vías de señalización reguladas por los genes diana; y el software "IPA" (Ingenuity Systems) para identificar las funciones y/o enfermedades biológicas que eran más relevantes para los datos. La expresión génica de varios genes diana (ITGA2, GALNT7, GALNT13, GALNT1, y COL1A2) se midió mediante RT-PCR para comparar su expresión con su desregulación prevista.

4.8 Transfección de microRNAs en la línea celular JEG3

La línea de cultivo celular trofoblástica JEG3 se cultivó al 50% de confluencia y posteriormente las células fueron transfectadas transitoriamente con 50 nM de miR-196b y miR-223 mímicos o secuencia sin sentido (scramble) utilizando HiPerfect siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.); tras 24, 48 y 72 horas se extrajo el RNA de las células. Para asegurarnos de que la fracción de microRNA se recuperaba se realizó la extracción del RNA usando el kit de miRNeasy (Qiagen). El RNA extraído se cuantificó mediante un

espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, EE.UU.) y la calidad de las muestras de RNA se evaluó mediante Bioanalyzer Nano LabChip 2100 (Agilent Technologies, Inc., DE, EE.UU.). La expresión génica de los genes diana previstos se realizó mediante PCR en tiempo real como se explica a continuación. Los experimentos se repitieron tres veces.

4.9 Validación de la eficacia de transfección mediante PCR cuantitativa

Para evaluar la eficacia de transfección, los niveles de miR-196b y miR-223 en JEG3 (en comparación con el housekeeping RNAU6-2) se midieron mediante PCR cuantitativa con el kit de transcripción reversa miScript, miScript SYBR Green PCR y miScript primers según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). En ambos casos los microRNAs trasfectados se incrementaron entre 1.000 y 10.000 veces en comparación con los controles. Además, aproximadamente el 95% de las células transfectadas con la secuencia sin sentido (scramble) presentó fluorescencia de GFP, lo que significa que el porcentaje de transfección fue cercano al 100%.

4.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los microarrays se utilizó el software MeV. Las muestras se agrupan en jerarquías o clústeres utilizando el test de correlación de Pearson, sometiéndose posteriormente a un análisis de componentes principales (PCA). Después, se asignó una variable grupo a cada muestra y se utilizó un análisis de significación de microarrays (SAM) para estimar los cambios en el nivel de expresión de los microRNAs entre las diferentes muestras. Se utilizó una corrección de tasa de falso descubrimiento (False Discovery Rate/FDR) de menos de 5%. Para el análisis estadístico de qPCR los niveles de expresión de las muestras fueron sometidas al test de Mann-Whitney utilizando el software SPSS v17.0. Para las predicciones proceso biológico se utilizó el test exacto de Fisher para calcular el valor de p.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Comparación mediante microarrays de microRNA entre tejido de EE y controles IVE

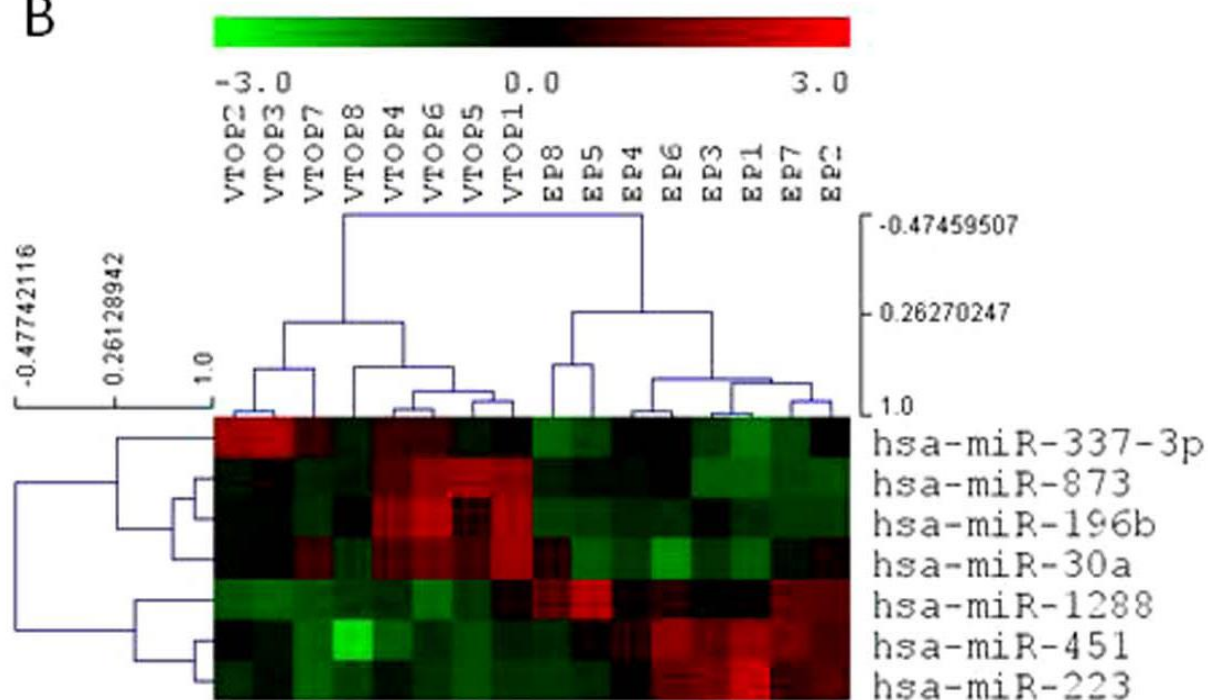
Se compararon un total de ochocientos sesenta y seis microRNAs en tejido embrionario de primer trimestre de ocho pacientes con EE y en tejido embrionario derivado de ocho pacientes controles que optaron por IVE, utilizando microarrays de microRNA. Las dieciséis muestras utilizadas en este estudio de microarrays pasaron un amplio control de calidad para RNA y microRNA (ver materiales y métodos). Entre los ochocientos sesenta y seis microRNAs seleccionados en nuestro microarray, la expresión de siete de ellos fue significativamente diferente entre tejido embrionario derivado de EE y el tejido embrionario derivado de IVE tras aplicar el análisis estadístico SAM con una corrección FDR (False Discovery Rate) de menos del 5% (Figura 10A). Hubo cuatro microRNAs (hsa-miR-196b, hsa-miR-30a, hsa-miR-873 hsa-miR-337-3p) cuya expresión se encontró disminuida en EE frente a los tejidos derivados de gestaciones normales, y tres microRNAs (hsa-miR-1288, hsa-miR-451 y hsa-miR-223) cuya expresión se encontró aumentada en el tejido derivado de EE en comparación con los controles IVE (Figura 10A). El microRNA cuya expresión se encontró más disminuida fue hsa-miR-196b, con una diferencia de 5,94 veces menor en comparación con el tejido derivado de IVEs; el microRNA con más aumento en su expresión fue hsa-miR-223, con una diferencia de 9,56 veces mayor en tejido derivado de EE en comparación con el tejido derivado de controles IVE.

Para confirmar que los resultados obtenidos a partir del microarray podría separar muestras derivadas de EE y derivadas de IVE, primero aplicamos un análisis de componentes principales (PCA) no supervisado, incluyendo todos los microRNAs medidos en el experimento de microarray (Figura 10C), donde no se apreciaba una clara separación entre las muestras de EE e IVE. Posteriormente, se aplicó un análisis de PCA supervisado con los siete microRNAs expresados diferencialmente, mostrando una clara diferencia entre los dos tipos de muestras analizadas, lo que indicaría que el tejido embrionario de EE se puede separar mediante un perfil de expresión de estos siete microRNAs de un embarazo en curso normal (Figura 10D). Además, ambos tipos de tejido embrionario se agruparon en dos poblaciones separadas (Figura 10B) de acuerdo con la expresión de estos siete microRNAs cuando realizamos un análisis de clúster.

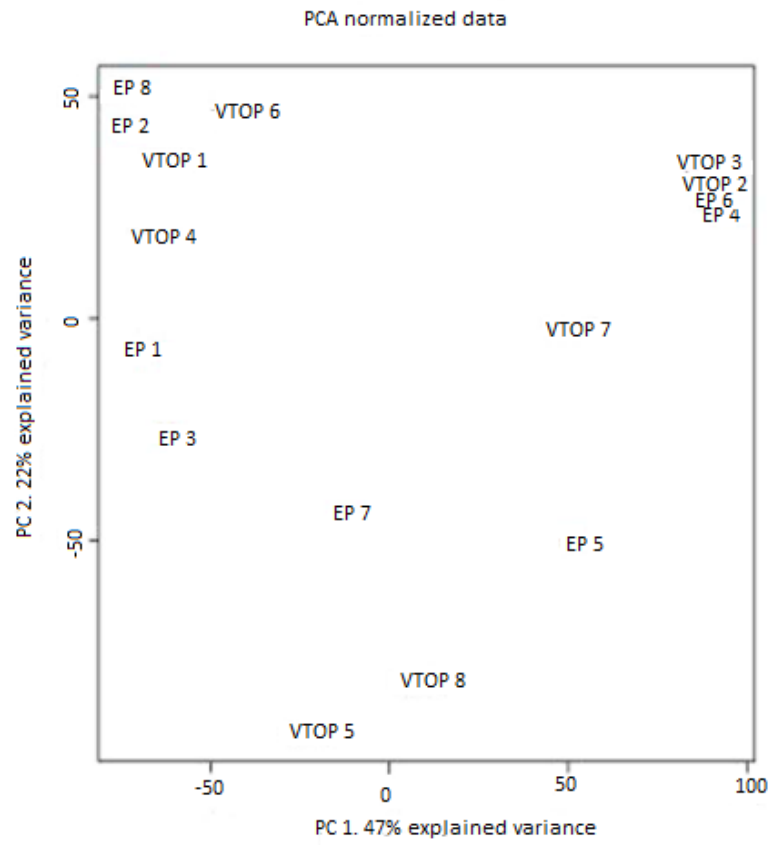
A

NAME	Fold-Change EP vs VTOP	q-VALUE
hsa-miR-196b	-5.94	<0.001
hsa-miR-30a	-2.72	<0.001
hsa-miR-873	-1.30	<0.001
hsa-miR-337-3p	-1.24	<0.001
hsa-miR-1288	1.21	<0.001
hsa-miR-451	3.44	<0.001
hsa-miR-223	9.56	<0.001

B



C



D

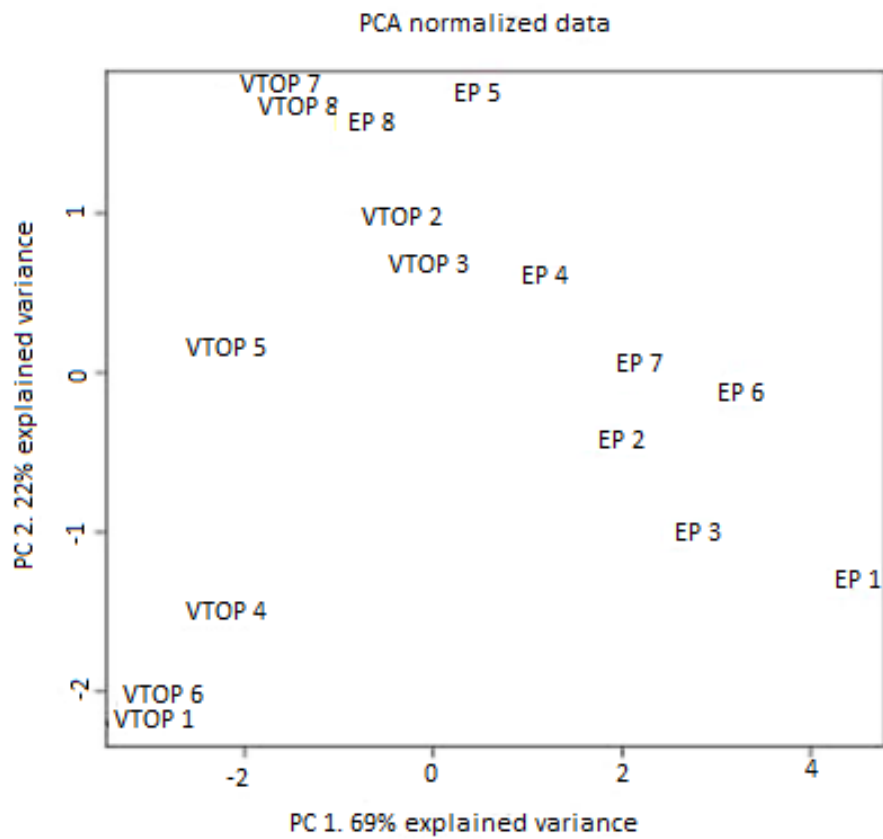


Figura 10. Lista de los microRNAs expresados diferencialmente en el tejido embrionario. Análisis de componentes principales (PCA) y de agrupamiento o clúster.

(A) microRNAs alterados de manera significativa en el tejido embrionario derivado de EE en comparación con IVE, utilizando análisis de microarrays. Los valores negativos representan regulación a la baja y los valores positivos representan regulación positiva.

(B) La agrupación y mapeo se realizó utilizando el software MeV agrupando las muestras en jerarquías utilizando la correlación de Pearson. Todas las muestras se clasificaron también en dos poblaciones diferentes (EE=EP-ectopic pregnancy en inglés; IVE=VTOP-Voluntary termination of pregnancy en inglés) de acuerdo con la expresión de estos siete microRNAs. Los niveles de expresión de estos microRNAs fueron estandarizados y se representan como un HEAT MAP que muestra la variación que va desde una expresión elevada (rojo) a una expresión baja (verde) en cada una de las muestras analizadas.

(C-D) Análisis de PCA (que determina las variables clave dentro del conjunto de datos que explican las diferencias entre las muestras) para todas las muestras de tejido incluidas en el estudio de microarrays, basado en los perfiles de expresión de todos (no supervisado) (C) y de los siete microRNAs expresados diferencialmente (supervisado) (D). Las muestras derivadas de EE se distinguen claramente de muestras IVE en una posición separada en el análisis PCA, y por otra parte, las muestras de EE y las muestras IVE se agrupa entre sí claramente cuando se analizan únicamente los siete microRNAs diferencialmente expresados (D)

5.2 Validación de los microRNAs en tejido embrionario mediante PCR en tiempo real

En primer lugar se realizó la validación de los microRNAs encontrados en el análisis de microarrays mediante PCR en tiempo real para hsa-miR-196 y hsa-miR-223 en las mismas dieciséis muestras utilizadas para los experimentos de microarrays (Figura 11). Posteriormente se validaron los cuatro microRNAs que tenían una diferencia de más de dos veces en la expresión en el análisis de microarrays mediante la realización de PCR en tiempo real en una cohorte más amplia de muestras. Se utilizaron veintiún muestras de tejido embrionario IVE y quince EE que no habían sido utilizadas para el estudio de microarray para los estudios de esta segunda validación. Se confirmó un aumento significativo de la expresión de hsa-miR-451 (Figura 12A) ($p < 0,001$) y hsa-miR-223 (Figura 12B) ($p < 0,05$) en las muestras de EE en comparación con las muestras control IVE, con un aumento todavía mayor que en nuestro estudio de microarrays. Se apreció una disminución en la regulación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para hsa-miR-196b en muestras derivadas de EE en comparación con controles de este conjunto de muestras (Figura 12D). Sin embargo, hsa-miR-30a no mostró ningún cambio en la expresión cuando se compararon muestras derivadas de EE y muestras IVE (Figura 12C).

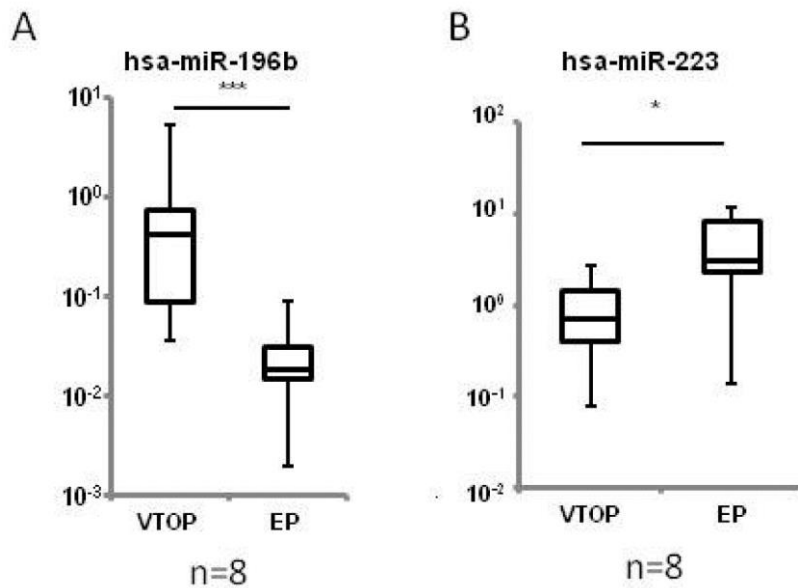
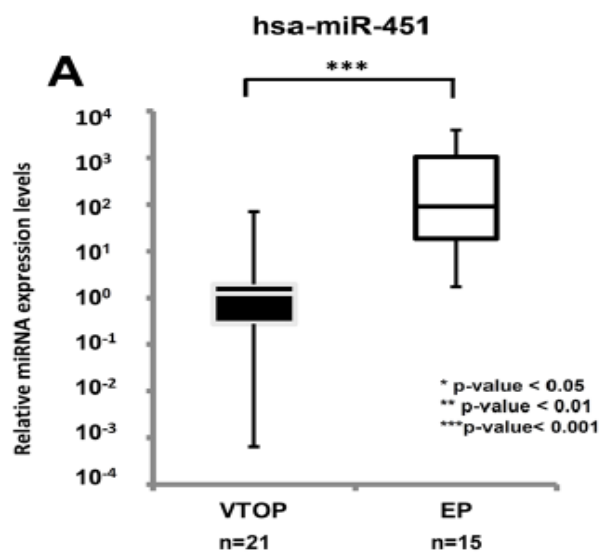
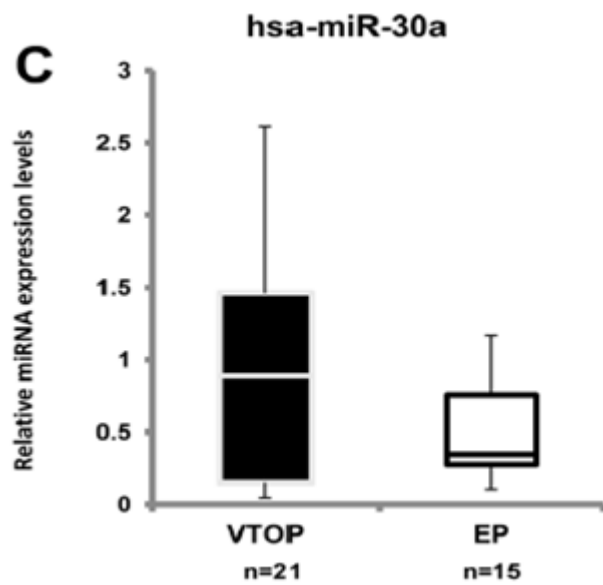
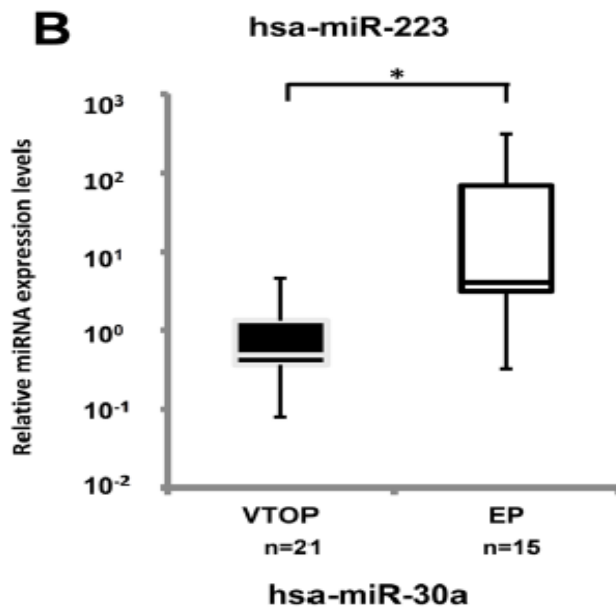


Figura 11. Validación mediante PCR en tiempo real en EE (EP) e IVEs (VTOP). Las mismas ocho muestras procedentes de IVEs y ocho muestras procedentes de tejido embrionario de EE que fueron utilizadas en los experimentos de microarrays fueron empleadas para validación mediante PCR en tiempo real. Se observó una disminución muy significativa ($p < 0,001$) en las muestras procedentes de EE en comparación con las muestras procedentes de IVEs en la expresión de hsa-miR-196b (A), mientras que la expresión de hsa-miR-223 (B) mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) en las muestras procedentes de EE en comparación con muestras procedentes de IVEs. Los datos se presentan como niveles relativos de expresión de los microRNAs. * Valor de $p < 0,05$; ** Valor de $p < 0,01$; *** Valor de $p < 0,001$. Los diagramas de cajas representan el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil; las barras de error muestran niveles máximos y mínimos relativos de expresión





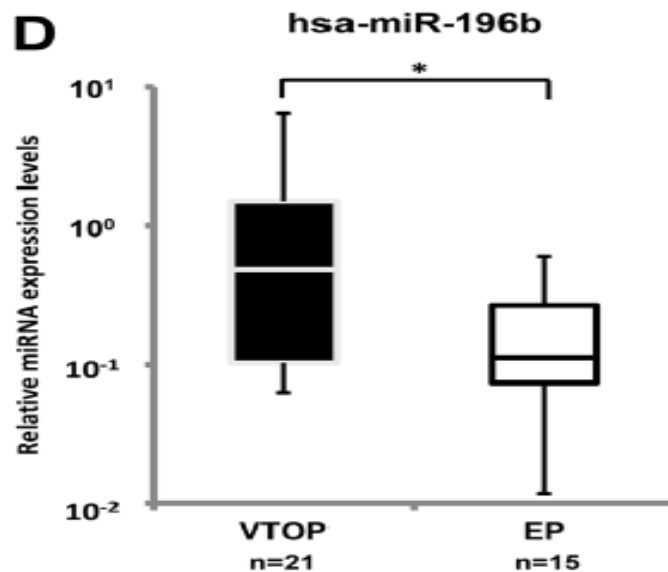


Figura 12. Segunda validación de los microRNAs en EE e IVE mediante PCR en tiempo real.

Muestras procedentes de veintiún IVE y quince EE distintas de las empleadas en los estudios de microarray fueron utilizadas para este estudio de validación. Se observa un aumento muy significativo ($p < 0,001$) en las muestras de tejido procedente de EE en comparación con muestras embrionarias procedentes de IVE para la expresión de hsa-miR-451 (A) y hsa-miR-223 (B), mientras que hsa-miR-196b (D) mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) en las muestras procedentes de EE en comparación con los controles IVE. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de hsa-miR-30a (C). Todos los datos se presentan como niveles relativos de expresión de microRNAs. *valor $p < 0,05$; ** valor $p < 0,01$; *** valor $p < 0,001$. Los diagramas de caja representan el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil; las barras de error muestran niveles máximos y mínimos relativos de expresión

5.3 Estudios bioinformáticos de dianas de los microRNAs y vías de señalización

Como primera aproximación al estudio funcional del perfil diferencial de los microRNAs identificados en EE e IVE, se realizó un análisis computacional para identificar los genes diana y vías de señalización que podrían ser modulados por los tres microRNAs expresados diferencialmente que se encontraron: miR-196b, miR-223 y miR-451. Para el

análisis *in silico*, hemos utilizado el software DIANA-miRPATH para analizar qué genes diana y vías de señalización podían ser alterados por los microRNAs expresados diferencialmente en los EE. Se encontraron diversas vías y genes potencialmente afectados por los microRNAs, sugiriendo que el perfil de expresión alterado de microRNAs en EE puede afectar la biosíntesis de mucinas, el metabolismo de las purinas, la interacción del receptor de matriz extracelular (ECM, y vías de señalización como MAPK y ErbB, entre otros (Tabla 5, figuras 13 y 14).

Vía de señalización KEGG	P valor (corregido FDR)	hsa-miR-196b	hsa-miR-30a	hsa-miR-873	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-1288	hsa-miR-451	hsa-miR-223
Biosíntesis de mucina O-glicano	3.95E-09		GALNT7, GALNT1	GALNTL6, GALNT13				
Metabolismo de purinas	1.20E-03	POLR3D	PGM1, NT5E, NP, NT5C3	AK3L1, PDE4A	PDE10A, PDE5A, ADK	NT5C2		ADCY3, PDE1A
Interacción del receptor ECM	3.83E-02	COL3A1, COL1A2, LAMA4	ITGA2, ITGA4		ITGA4	ITGAV		
Vía de señalización MAPK	3.83E-02	NRAS, MAP4K3, MAP3K1, RASGRP1, MAPK8	PPP3CA, JUN	STK4, MAP4K3, RPS6KA2, RRAS2, NTRK1, RPS6KA3, ELK1	KRAS, AC012652.1, RPS6KA3, TGFBR2	EVI1	ATF2	FGF12, DUSP14, CASP3, CACNB1, RPS6KA3, AKT3, MAP3K2, FGF7, GRB2
Vía de señalización ErbB	1.20E-03	NRAS, MAPK8, ABL1	JUN	SHC4, ELK1	KRAS, ERBB4, RPS6KB1	PAK7	EREG	AKT3, GRB2

Tabla 5. Vías y genes potencialmente afectados por nuestros microRNAs diferencialmente expresados. El perfil de expresión alterado de microRNAs en EE puede afectar a la biosíntesis de mucina, el metabolismo de las purinas, la interacción del receptor ECM y vías de señalización como MAPK y ErbB, entre otros.

ERBB SIGNALING PATHWAY

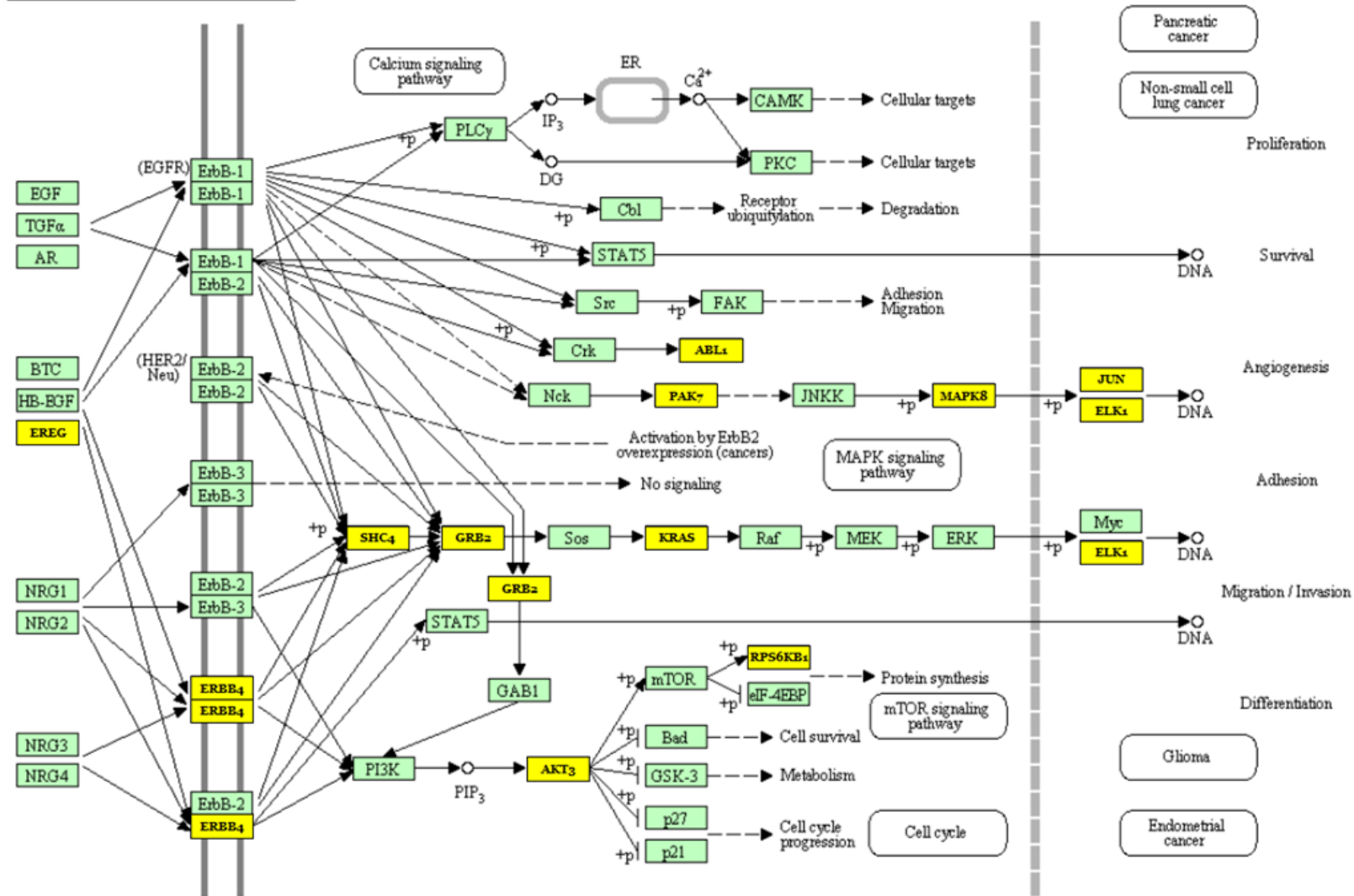


Figura 13. En esta figura se muestran como ejemplo los genes afectados por los microRNAs (en amarillo) de la vía de señalización ErbB

MUCIN TYPE O-GLYCAN BIOSYNTHESIS

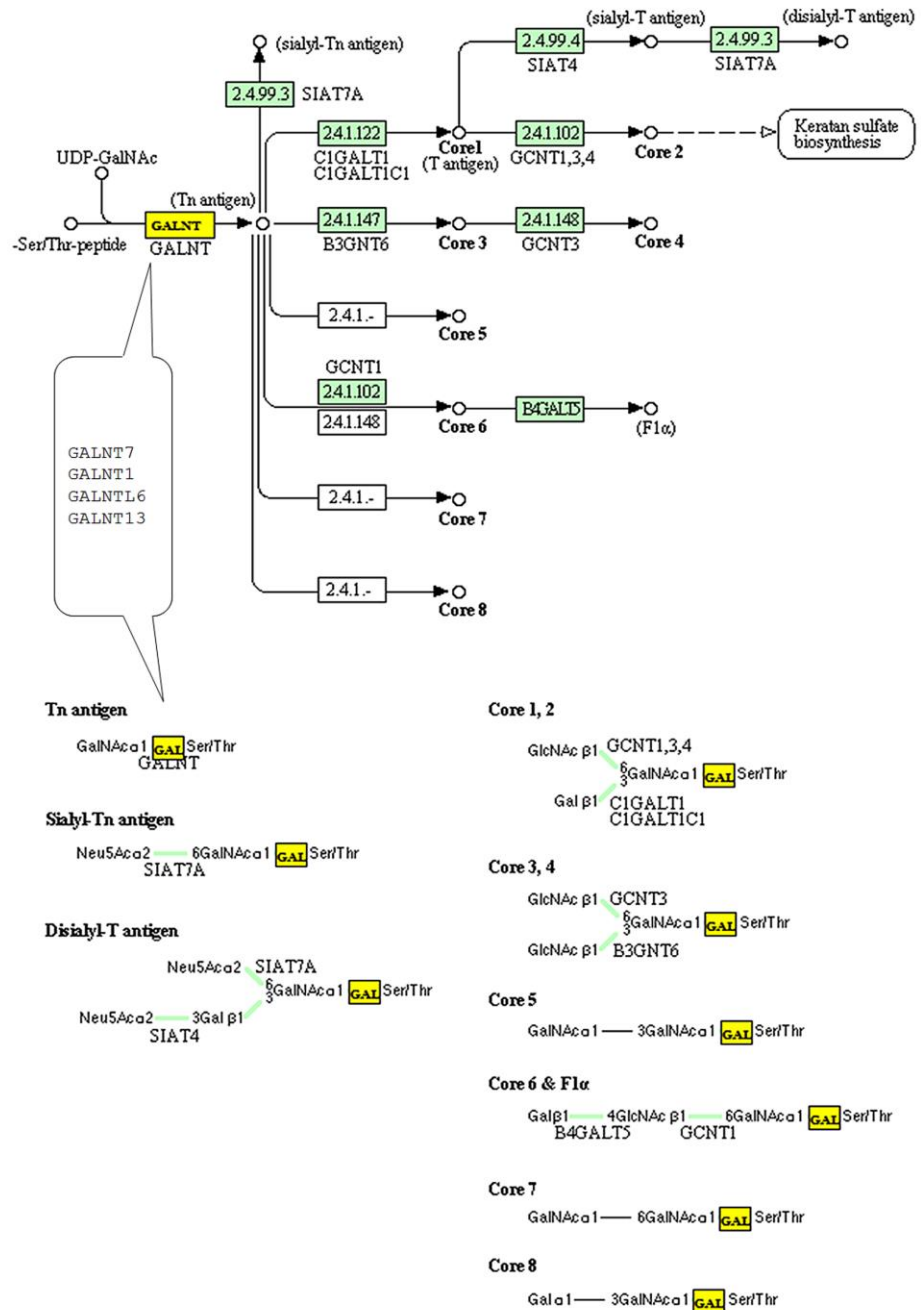


Figura 14. Vías de señalización de la biosíntesis de mucina tipo O-glicano. En esta figura se muestran como ejemplo los genes afectados por los microRNAs (en amarillo) de la vía de señalización de la síntesis de mucinas.

5.4 Análisis de la expresión de los genes diana por PCR a tiempo Real

Como ya hemos comentado, las vías de señalización afectadas más significativas fueron la biosíntesis de mucina tipo O glicano y las vías de interacción ECM-receptor (Tabla 5). Se encontraron tres genes diferentes que fueron alterados en la vía de mucina: GALNT7 y GALNT13 (reprimidos por 196b), y GALNT1 (reprimido por 223; Figura 15A). Otros dos genes, la integrina A2 (ITGA2) y la cadena alfa-2 (I) del colágeno (COL1A2), también fueron blanco de estos dos microRNAs. Para comprobar la capacidad de estos microRNAs para inhibir la expresión de estos genes diana predichos, se realizó PCR en tiempo real en todos estos genes diana en nuestras muestras. La regulación significativa fue confirmada para GALNT13 y ITGA2 cuando comparamos muestras EE con los controles (Figura 15B). Sin embargo, no hemos podido encontrar diferencias significativas en la expresión de GALNT7, GALNT1 o COL1A2, aunque en los tres casos se aprecia una tendencia coincidente con la inhibición predicha (figura 15B).

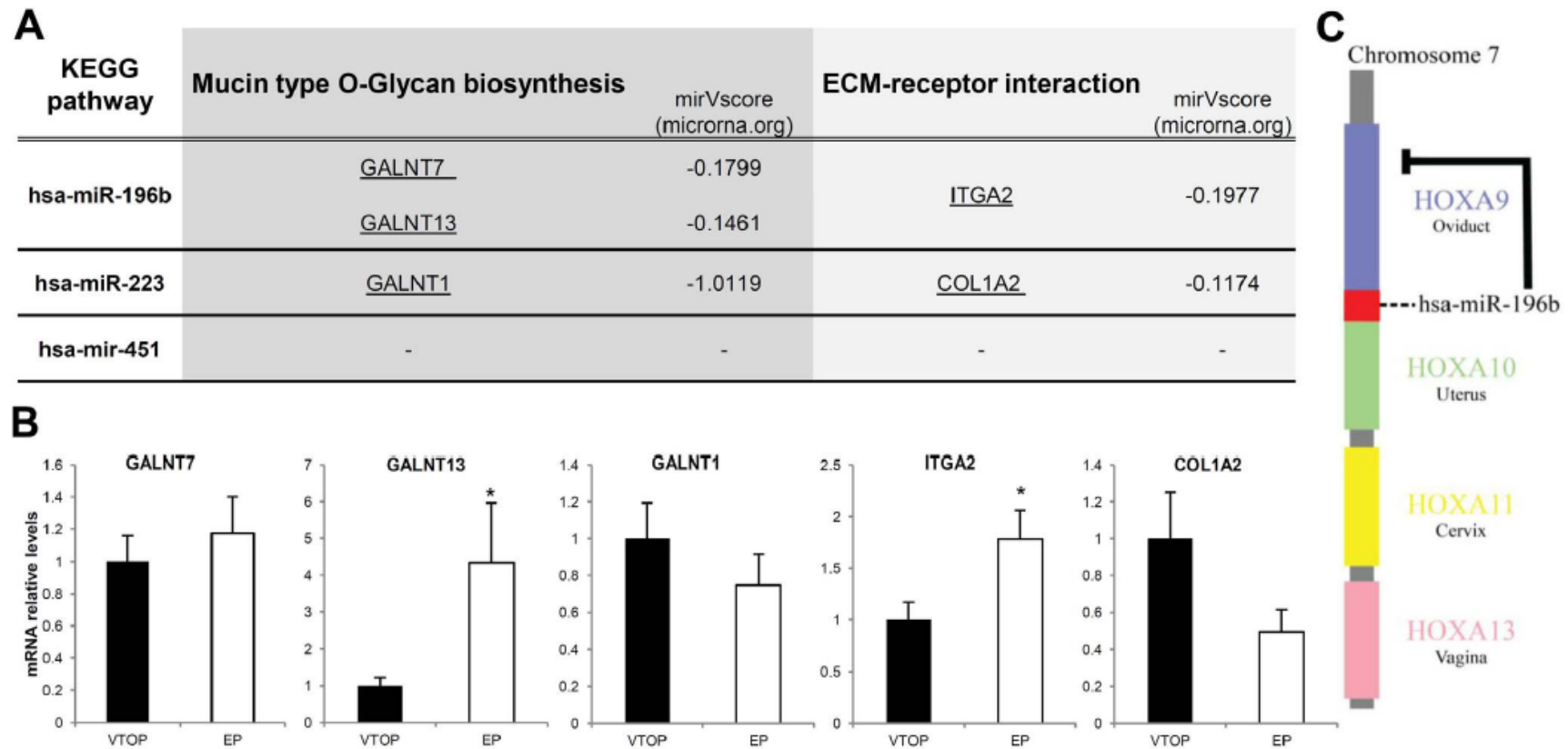
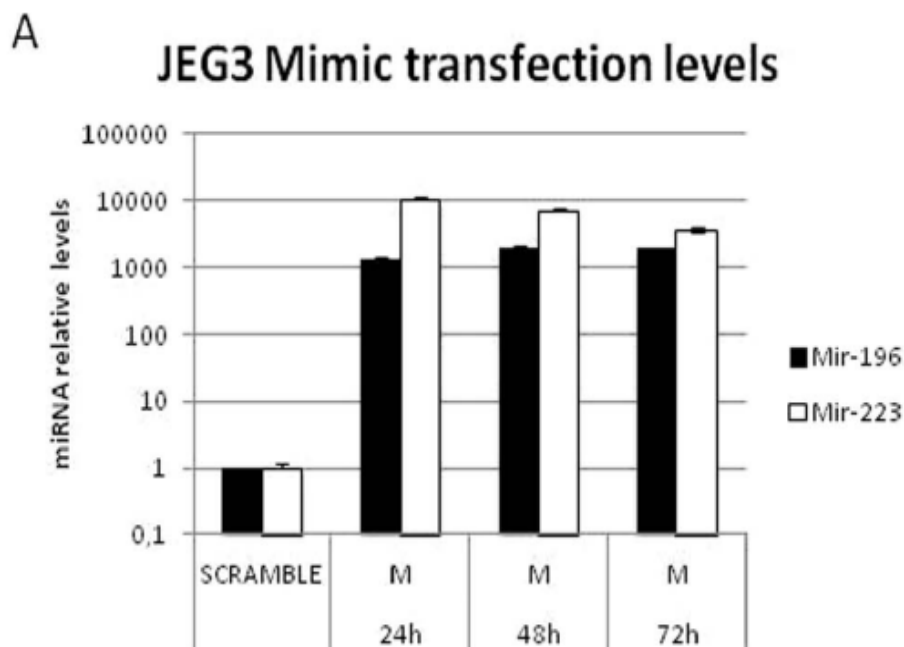


Figura 15. Genes predichos y validación génica. (A) Vías de señalización KEGG más significativas para los microRNAs miR-196b, 223 y 451 junto con los genes diana para cada microRNA y sus mirV score. (B) Se realizó PCR en tiempo real en tejidos embrionarios de EE e IVEs para cada uno de los genes diana previstos: GALNT7, GALNT13, GALNT1, ITGA2 y COL1A2. Se observó un aumento significativo en la expresión de GALNT13 e ITGA2 en las muestras procedentes de EE en comparación con las muestras procedentes de IVEs. (C) hsa-miR-196b es codificado en un intrón del gen HOXA9 e inhibe la expresión del mismo.

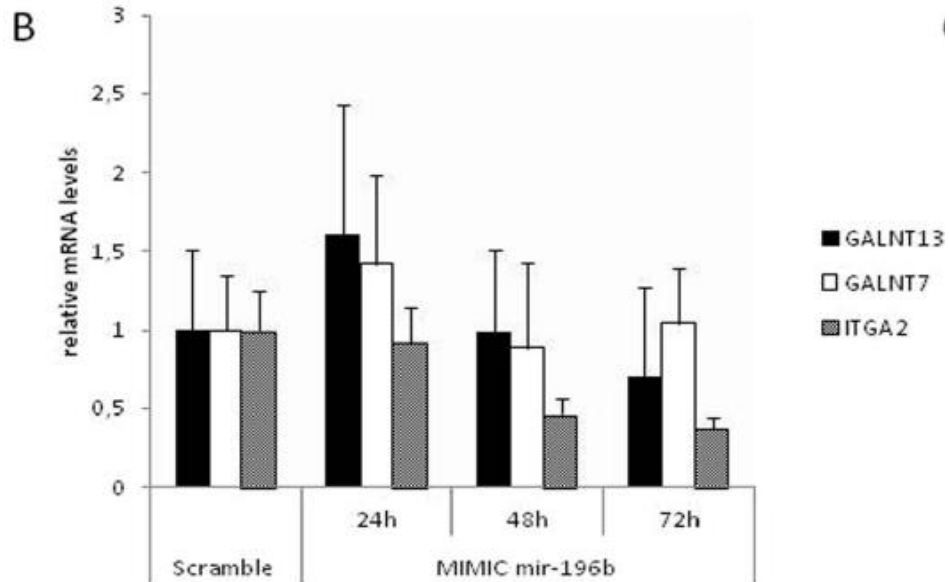
5.5 Transfección in vitro de miR-196b y miR-223 en la línea celular trofoblástica JEG3

Para probar funcionalmente que estos microRNAs podrían tener un efecto directo en la supresión de genes diana realizamos la transfección de la línea celular trofoblástica JEG3 con microRNAs mimicos para miR-196b y miR-223 y medimos la expresión génica de los genes diana previstos (GALNT7, GALNT13 y ITGA2 para miR-196b; GALNT1, COL1A2 y MUC-1 para miR-223).

Primeramente comprobamos que la transfección de los mimicos producía un aumento de los niveles de estos microRNAs en la línea celular JEG3 (Figura 16A). Observamos que el incremento de microRNAs en nuestra línea celular estaba entre 1000 y 10.000 veces. La acción del mimico de miR-196 produjo cambios no significativos en la expresión de los genes diana previstos estudiados 48 y 72 horas tras la transfección (figura 16B), aunque se observó una tendencia pronunciada a la baja para ITGA2. Cuando transfectamos la línea celular JEG3 con el mimico de miR-223 se observó con el tiempo una disminución significativa en la expresión de GALNT1. No se observó una disminución en la expresión de COL1A2 ni MUC1 (figura 16C).



JEG3 transfected with miR-196b mimic



JEG3 transfected with miR-223 mimic

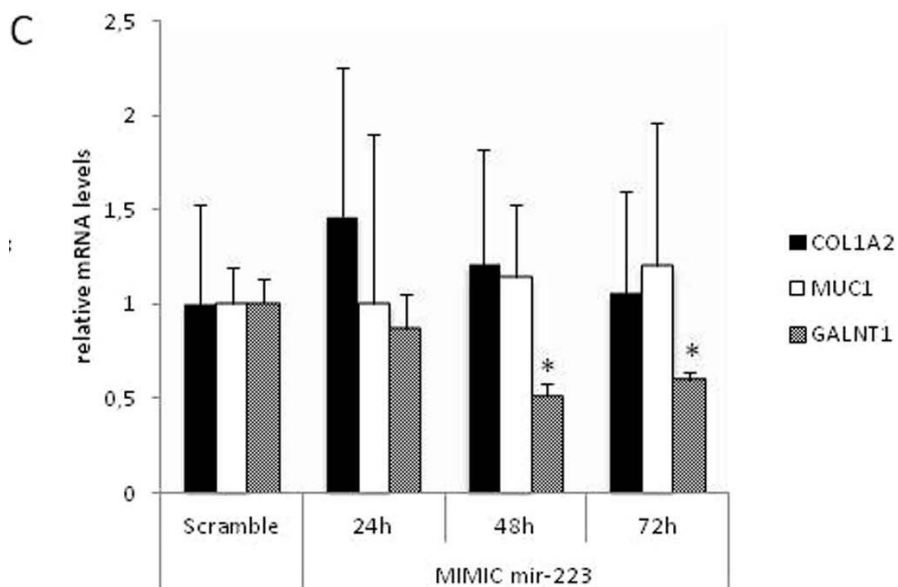


Figura 16. Transfección de las líneas celulares trofoblásticas con miR-196 y miR-223. La línea celular JEG3 se usó para comprobar la inhibición de miR-196b y miR-223 mímicos sobre los genes diana

previstos. Los niveles de expresión de microRNAs fueron medidos tras la transfección con los mímicos mediante PCR en tiempo real y comparados con la expresión del scramble o secuencia control (A). Las células JEG3 transfectadas con el mímico de miR-196b mostraron una fuerte disminución de ITGA2 tras 48 y 72 horas de transfección, mientras que GALNT13 mostró una disminución más leve (B). Se observó una disminución significativa de la expresión de GALNT1 en células JEG3 tras 48 y 72 horas de transfección con miR-223 (C). Todos los datos se muestran como niveles de expresión de miRNA relativos. *p-value <0,05.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSION

En la actualidad, se ha puesto de manifiesto que la regulación de multitud de procesos biológicos no depende solamente de mecanismos de control transcripcional, sino que además engloba mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA o las modificaciones postraduccionales de histonas, pero también elementos no convencionales de regulación de la expresión génica, como ciertos RNAs pequeños no codificantes. El 98% del transcriptoma humano está compuesto por RNA no codificante para proteínas, incluyéndose en esta definición el RNA de transferencia, el ribosómico y el microRNA (Kotlaboba *et al* 2011).

En lo que a reproducción se refiere, cada vez hay más evidencia que diversos mecanismos epigenéticos están implicados en la regulación de cambios en el endometrio, como por ejemplo en la implantación embrionaria (Galliano *et al* 2014) y el desarrollo inicial del embrión (Wang *et al* 2013).

La evidencia cada vez más sugiere que los microRNAs son importantes reguladores del desarrollo placentario (Donker *et al* 2007). Determinados estudios *in vitro* han demostrado que ciertos microRNAs regulan la proliferación celular del trofoblasto, su migración, invasión, apoptosis y angiogénesis. Además, también ha sido demostrada la expresión aberrante de microRNAs en la placenta de mujeres con embarazos anormales (Luo *et al* 2012).

Estudios del departamento de Fisiología de la Universidad de Córdoba han demostrado una abundante expresión de Lin28B (un microRNA) en placenta humana en distintas etapas de la gestación, apuntando a un posible papel del sistema Lin28B/Let-7 en el control de determinados aspectos del desarrollo y fisiología placentaria (Domínguez *et al* 2014). Se trata de un sistema supresor tumoral bajo el control de Lin28B, que podría tener un papel relevante en el éxito de la placentación (Viswanathan *et al* 2008, Heo *et al* 2008).

El mecanismo por el cual es regulada la expresión de microRNAs en la placenta humana no es del todo conocido. La cantidad de oxígeno, cuyo papel es crítico en el desarrollo placentario, se ha demostrado que es un importante regulador de la expresión de los genes de microRNAs en placenta, siendo la hipoxia un factor de gran importancia; es el caso, por ejemplo, de miR-210, un importante sensor de hipoxia, aumentando sus niveles ante la misma en las células trofoblásticas (Lee *et al* 2011). Por otro lado, moléculas de señalización y toxinas ambientales también están involucradas en el control de la expresión de microRNAs en células trofoblásticas; es el caso de LIF (leukemia inhibitory factor), regulador de las funciones

trofoblásticas y que aumenta los niveles de miR-21 y miR-93, pero disminuye los niveles de miR-141 (Morales-Prieto *et al* 2011). Por otra parte, el bisfenol A aumenta la expresión de varios microRNAs en líneas trofoblásticas, como por ejemplo el miR-146a (Avisar Whiting *et al* 2010).

En lo que a embarazo ectópico se refiere, algunos autores han sugerido el microRNA miR323-3p como posible marcador de embarazo ectópico (Zhao *et al* 2012). Este microRNA está codificado en la región 14q32.31, considerada como una de las regiones críticas para el desarrollo embrionario. Determinados estudios sugieren que sus niveles se encontrarían aumentados en las pacientes con gestación ectópica, siendo esta molécula vertida al torrente materno resultado de la apertura capilar que se produce debido al daño y erosión que se produce en la trompa de Falopio. Sin embargo, otros autores refieren que miR323-3p no está limitado al trofoblasto (Miura *et al* 2010), por lo que realmente sus niveles aumentados podrían ser debidos y producidos por el propio daño tisular en la trompa y a la inflamación peritoneal y no a que son vertidos al torrente procedentes del embrión.

Por otro lado, algunos autores han demostrado que una disminución significativa en la expresión DICER1 se acompaña de una desregulación significativa de numerosos microRNAs, como let-7i, miR-149, miR-182 y miR-424 en tejido tubárico de pacientes con gestación ectópica, sugiriendo que la función aberrante de sus dianas Nedd4, TAF15 y SPEN podrían contribuir a la aparición de un embarazo ectópico tubárico; ahora bien, se necesitan más estudios para determinar si la alteración de la biogénesis de los microRNAs y los cambios posteriores en la regulación de los genes diana están relacionados con las mujeres en riesgo de embarazo ectópico (Feng *et al* 2014).

Diferenciar la gestación normal de la anómala y conocer la causa fundamental de la misma y los mecanismos por los que se produce es todavía actualmente un desafío clínico. Sería por tanto conveniente el estudio y evaluación de perfiles de expresión tisulares y potencialmente bioquímicos en el torrente materno para el diagnóstico certero y precoz de esta patología, evitándose de esta manera accidentes o intervenciones quirúrgicas innecesarias. Por este motivo la detección de microRNAs expresados en tejido embrionario e implicados en la fisiopatología del embarazo ectópico podría ayudarnos a comprender qué mecanismos son responsables de esta patología y quizá ofrecer una herramienta en el diagnóstico del embarazo ectópico, si la placentación extrauterina determinara perfiles de microRNAs tisulares (y posiblemente circulantes) distintos de los de la gestación normal.

Ésta es la primera investigación que analiza el conjunto global diferencial de

microRNAs en tejido embrionario in vivo procedente de EE tubáricos usando como controles IVEs. Aunque se ha estudiado también el sistema Lin28/Let-7 en muestras procedentes de EE e IVEs (Domínguez *et al* 2014), no se ha realizado todavía un abordaje global en el estudio de microRNAs y EE.

Elegimos IVEs como controles ya que se trataba de gestaciones viables, con un tejido trofoblástico en crecimiento teóricamente sano, eliminando de esta manera factores externos como tóxicos, enfermedades cromosómicas, trombofilias no diagnosticadas, etc, que podrían ser la causa subyacente, por ejemplo, de los abortos espontáneos, en los que las diferencias observadas podrían deberse a diferencias en la viabilidad del tejido y no a la implantación anómala, como ocurre en el caso del EE. En nuestro estudio de microarrays se encontraron siete microRNAs expresados de manera diferencial en tejido procedente de EE y tejido procedente de IVE. En cuatro de ellos (hsa-miR-196b, hsa-miR-30a, hsa-miR-873 y hsa-miR-337-3p) se observó una disminución de la expresión, mientras que en tres de ellos (hsa-miR-1288, hsa-miR-451 y hsa-miR-223) se observó un aumento en la expresión, en muestras procedentes de EE comparado con muestras procedentes de IVEs.

Aunque algunos estudios han demostrado con anterioridad la expresión diferencial de genes en las trompas de Falopio de pacientes con EE (Horne *et al* 2009), hasta la fecha ninguno de ellos ha empleado tejido embrionario de IVEs como controles.

De estos siete microRNAs, tres de ellos (hsa-miR-196b, hsa-miR-223 y hsa-miR-451) fueron validados mediante PCR en tiempo real en un número mayor de muestras EE y controles. Estos microRNAs podrían alterar la expresión de docenas de genes, y por tanto investigar sus dianas podría ayudarnos a dilucidar los mecanismos moleculares que intervienen en la etiopatogenia del EE.

Somos conscientes que no sabemos el origen exacto de estos microRNAs en nuestras muestras y sería muy interesante abordar este asunto en futuras investigaciones. Las muestras procedentes de EE e IVEs están compuestas por tejidos muy complejos y el origen de estos microRNAs podría ser de vital importancia para entender sus efectos autocrinos y paracrinos.

Mediante el empleo de herramientas bioinformáticas, analizamos todos los potenciales genes diana de los tres microRNAs, obteniendo las principales vías de señalización que podrían ser alteradas en EE comparado con gestaciones intrauterinas normales. Entre estas vías, la biosíntesis de mucina fue la más estadísticamente significativa. Dos microRNAs (hsa-miR 196b y hsa-miR 223) podrían tener como diana tres genes de gran importancia en las vías de

señalización de biosíntesis de mucina: GALNT7, GALNT1 y GALNT13. Observamos que estos dos microRNAs estaban alterados en las muestras procedentes de EE comparado con controles, significando que su expresión podría estar también alterada en tejidos embrionarios de EE, estando además implicados en anomalías en la síntesis de mucina. De hecho, cuando comprobamos si la expresión de GALNT13 estaba aumentada en muestras procedentes de EE, observamos que dicha expresión estaba aumentada, tal y como esperábamos. Es destacable que no todos los genes mostraron diferencias significativas en la expresión entre ambas situaciones, tal y como era de esperar. Éste es el caso de GALNT7, GALNT1 y COL1A2, originando algunas dudas sobre la implicación real de estas vías de señalización in vivo.

Aunque observamos algunas disparidades en nuestros resultados, algunos estudios recientes han observado una desregulación de MUC1 y una glicosilación alterada en el epitelio tubárico de EE comparado con controles (Al-Azemi *et al* 2009, Refaat *et al* 2012). Además, otro estudio reciente demuestra la expresión deficiente de MUC-1 en 5 pacientes con embarazo ectópico recurrente, demostrando la importancia de una adecuada regulación de la vía de síntesis de este O-glicano (Bozdag *et al* 2011).

Otra vía de señalización estadísticamente significativa en nuestro estudio fue la de receptores de la matriz extracelular (ECM), con la posibilidad de interacción de hsa-miR-196b y hsa-miR-223 de interacción con dos genes diana (COL1A2 y ITGA2); también confirmamos un aumento significativo en la expresión de la integrina A2 (ITGA2) en muestras EE.

Otros autores muestran que todas las células trofoblásticas expresan metaloproteinasas de la matriz (MMPs), y sus reguladores, inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) (Bai *et al* 2005). Estas células trofoblásticas expresan TIMP-1, -2 y -3, MMP-2 y MMP-9, pero en tejido trofoblástico invasivo hay un incremento de TIMP-1, -2, MMP-2 y MMP-14, lo que explicaría los efectos reguladores e interacciones de los diferentes microRNAs en células trofoblásticas con los componentes de la matriz extracelular (ECM). Este patrón único de expresión de MMP y TIMP en la interfaz feto-materna, combinado con nuestros datos sobre microRNAs, apoya la regulación de estas proteínas por inhibición de microRNAs que a su vez podría alterar la invasión trofoblástica durante la implantación y la placentación, al menos en EE.

Más específicamente, uno de los microRNAs disminuidos en tejido de EE, hsa-miR-196b, se ha descrito también disminuido en células del estroma endometrial y parece dirigir la supresión de la expresión del mRNA de c-myc y bcl-2 así como inhibir la proliferación e inducir la apoptosis de estas células (Abe *et al* 2013). Curiosamente, la secuencia hsa-miR-196b está localizada en el cromosoma 7, y está codificada en un intrón del gen HOXA9. Esto es

interesante, dado que HOXA9 es el principal gen HOX que dirige la formación de la trompa de Falopio durante el desarrollo de las estructuras mullerianas (figura 15C), y se expresa en tejido oviducto adulto en ratones y humanos (Salih *et al* 2004), ya que hsa-miR-196b puede inhibir directamente la expresión de HOXA9 en tumores (Li *et al* 2012).

Finalmente estudiamos *in vitro* si la transfección de estos microRNAs en las líneas celulares trofoblásticas podría alterar la expresión génica de estos potenciales genes diana. Nos centramos en la síntesis de mucina y el receptor de interacciones de la matriz extracelular. La sobreexpresión *in vitro* de estos microRNAs desencadena una clara disminución en la expresión de algunos genes previstos como ITGA2 en el caso de hsa-miR-196b y GALNT1 en el caso de hsa-miR-223, pero la expresión de otros genes previstos permanece sin alteraciones. Este hallazgo significa que aunque algunos microRNAs podrían alterar directamente la expresión de genes previstos, la alteración de las vías de señalización propuestas no está completamente demostrada, por lo que serían necesarios más estudios al respecto. Es importante a tener en cuenta que el software predice genes diana teóricos con distintos rangos de probabilidad, pero en ocasiones estas predicciones no concuerdan con los datos reales (Moreno-Moya *et al* 2014). Por otro lado, los microRNAs tienen múltiples genes diana (en ocasiones, incluso más de 1000 genes). Por tanto, miR-196b y miR-223 podrían tener como diana otros genes inesperados o todavía no descritos, siendo algunos de ellos responsables de los genes implicados en la regulación de estas vías de señalización, equilibrando la expresión de nuestros genes seleccionados. Por estas razones, la predicción de genes diana podría ser una aproximación inicial, pero en ocasiones, tal y como hemos observado, no se identifican (directa o indirectamente) los genes diana reales. Muchos de estos genes diana no han sido estudiados con anterioridad, por lo que serían adecuados más estudios, quizá empleando ensayos de luciferasa u otras técnicas que demuestren directamente los genes diana de estos microRNAs. Esta inesperada discrepancia podría también ser debida al empleo de líneas celulares inmortalizadas, en lugar de células trofoblásticas primarias. En ocasiones, este tipo de líneas celulares no se comporta como tejido primario o células derivadas del mismo.

En nuestra opinión, es necesario el estudio de los efectos que tienen estos dos microRNAs en los niveles globales de expresión de las células trofoblásticas para encontrar realmente qué vías de señalización están afectadas por estos dos microRNAs.

En resumen, hemos encontrado un patrón diferencial de expresión de microRNAs en tejidos embrionarios derivados de gestaciones eutópicas y ectópicas, y hemos identificado algunas vías de señalización candidatas que podrían estar implicadas en los procesos de implantación y placentación tempranas, aunque el significado real de estas vías de señalización

en EE es todavía desconocido.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Existe un patrón diferencial de expresión de microRNAs entre el tejido embrionario trofoblástico sano y el procedente de gestaciones ectópicas.
2. Los microRNAs miR-196b, miR-30a, miR-873 y miR-337-3p se encontraron disminuidos en tejido ectópico comparado con tejido embrionario sano procedente de gestaciones intrauterinas normales.
3. Los microRNAs miR-1288, miR-451 y miR-223 se encontraron aumentados en tejido ectópico comparado con tejido embrionario sano procedente de gestaciones intrauterinas normales.
4. Los microRNAs miR-451, miR-223, miR-30a y miR-196 fueron validados por la técnica de PCR cuantitativa, confirmando los resultados obtenidos por microarray.
5. El estudio de dianas de los microRNAs diferencialmente expresados miR-196b, miR-223 y miR-451 muestra como los genes GALNT7, GALNT13 y GALNT1 pertenecientes a la ruta de la síntesis de O-Glicanos y los genes ITGA2 y COL1A2 pertenecientes a la ruta del receptor de la matriz extracelular (ECM) se encuentran desregulados en tejido embrionario procedente de gestaciones ectópicas comparado con tejido embrionario sano de gestaciones intrauterinas.
6. La transfección in vitro de los microRNAs miR-196b y miR-223 en células trofoblásticas demostró que se producía un efecto de reducción de la expresión génica de los genes ITGA2 y GALNT1.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. **BIBLIOGRAFÍA**

- Abe W, Nasu K, Nakada C, Kawano Y, Moriyama M, Narahara H. miR-196b targets c-myc and Bcl-2 expression, inhibits proliferation and induces apoptosis in endometriotic stromal cells. *Hum Reprod.* 2013;28(3):750-61.
- Al-Azemi M, Refaat B, Aplin J, Ledger W. The expression of MUC1 in human fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2009;24(10):2582-7.
- Alsuleiman SA, Grimes EM. Ectopic pregnancy: a review of 147 cases. *J Reprod Med.* 1982;27(2):101-6.
- Altmäe S, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci.* 2013;20(3):308-17.
- Ankum WM, Mol BV, Van der Veen F, Bossuyt PM. Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 1996;65(6):1093-9.
- Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(3):268-79.
- Arteaga Martínez, García Peláez. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo.* 1ª edición. Madrid. Panamericana; 2014.
- Ash A, Smith A, Maxwell D. Caesarean scar pregnancy. *BJOG.* 2007;114(3):253-63.
- Avissar-Whiting M, Veiga KR, Uhl KM, Maccani MA, Gagne LA, Moen EL, et al. Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod Toxicol.* 2010;29(4):401-6.
- Bai SX, Wang YL, Qin L, Xiao ZJ, Herva R, Piao YS. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction.* 2005;129(1):103-13.
- Bajo Arenas JM, Melchor Marcos JC, Mercé LT. *Fundamentos de Obstetricia (SEGO).* Madrid. Grupo ENE Publicidad; 2007.

- Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, et al. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* 2004;14(12):2486-94.
- Barnhart KT, Gosman G, Ashby R, Sammel M. The medical management of ectopic pregnancy: a meta-analysis comparing "single dose" and "multidose" regimens. *Obstet Gynecol.* 2003;101(4):778-84.
- Barnhart KT, Sammel MD, Gracia CR, Chittams J, Hummel AC, Shaunik A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril.* 2006;86(1):36-43.
- Barnhart KT. Clinical practice. Ectopic pregnancy. *N Engl J Med.* 2009;23:361(4):379-87.
- Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010;11(8):R90.
- Birkhahn RH, Gaeta TJ, Paraschiv D, Bove JJ, Suzuki T, Katoh H, et al. Serum levels of myoglobin, creatine phosphokinase, and smooth muscle heavy-chain myosin in patients with ectopic pregnancy. *Ann Emerg Med.* 2001;38(6):628-32.
- Bjartling C, Osser S, Persson K. Deoxyribonucleic acid of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue from the fallopian tubes of patients with ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;134(1):95-100.
- Bouyer J, Coste J, Fernandez H, Pouly JL, Job-Spira N. Sites of ectopic pregnancy: a 10 year population-based study of 1800 cases. *Hum Reprod.* 2002;17(12):3224-30.
- Bozdag G, Atak ZG, Yapici Z, Demiroglu A, Usubutun A, Gurgan T. Five recurrent ectopic pregnancies in a patient with MUC1 expression deficiency. *J Obstet Gynaecol.* 2011;31(7):666-7.
- Bueno MJ, de Castro IP, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle.* 2008;7(20):3143-8.
- Carlson BM. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 5ª edición. Barcelona: Elsevier-Saunders; 2014.

- Cartwright J, Duncan WC, Critchley HO, Horne AW. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reproduction*. 2009;138(1):9-22.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ectopic pregnancy--United States, 1990-1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1995;44(3):46-8.
- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(4):1290-7.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-4, 536-7.
- Chu VT, Gottardo R, Raftery AE, Bumgarner RE, Yeung KY. MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. *Genome Biol*. 2008;9(7):R118.
- Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2015;15(2):103-13.
- Cohen J, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML, Schwartz D. In-vitro fertilization and embryo transfer: a collaborative study of 1163 pregnancies on the incidence and risk factors of ectopic pregnancies. *Hum Reprod*. 1986;1(4):255-8.
- Condous G, Lu C, Van Huffel SV, Timmerman D, Bourne T. Human chorionic gonadotrophin and progesterone levels in pregnancies of unknown location. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;86(3):351-7.
- Condous G, Okaro E, Bourne T. Pregnancies of unknown location: diagnostic dilemmas and management. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17(6):568-73.
- Condous G, Timmerman D, Goldstein S, Valentin L, Jurkovic D, Bourne T. Pregnancies of unknown location: consensus statement. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2006;28(2):121-2.
- Connerty P, Ahadi A, Hutvagner G. RNA binding proteins in the miRNA pathway. *Int J Mol Sci*. 2015;17(1).

- Creanga AA, Shapiro-Mendoza CK, Bish CL, Zane S, Berg CJ, Callaghan WM. Trends in ectopic pregnancy mortality in the United States: 1980-2007. *Obstet Gynecol.* 2011;117(4):837-43.
- Daponte A, Pournaras S, Polyzos NP, Tsezou A, Skentou H, Anastasiadou F, et al. Soluble FMS-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and serum placental growth factor (PlGF) as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(9):E1444-51.
- Daponte A, Pournaras S, Zintzaras E, Kallitsaris A, Lialios G, Maniatis AN, et al. The value of a single combined measurement of VEGF, glycodelin, progesterone, PAPP-A, HPL and LIF for differentiating between ectopic and abnormal intrauterine pregnancy. *Hum Reprod.* 2005;20(11):3163-6.
- Dart R, Ramanujam P, Dart L. Progesterone as a predictor of ectopic pregnancy when the ultrasound is indeterminate. *Am J Emerg Med.* 2002;20(7):575-9.
- De los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, et al. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol Reprod.* 199;54(3):563-574.
- Domínguez F, Castelló D. *Vitrification in Assisted Reproduction*. 2nd edition. Florida: CRC Press; 2015. ISBN: 978-1-4822-4258-4.
- Domínguez F, Lozoya T, Romero-Ruiz A, Steffani L, Martínez S, Monterde M, et al. The Lin28/Let-7 system in early human embryonic tissue and ectopic pregnancy. *PLoS One.* 2014;9(1):e87698.
- Donker RB, Mouillet JF, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(4):273-9.
- Ezzati M, Djahanbakhch O, Arian S, Carr BR. Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(10):1337-47.
- Farquhar CM. Ectopic pregnancy. *Lancet.* 2005;366(9485):583-91.

- Faure A, Atkinson J, Bouty A, O'Brien M, Levard G, Hutson J, et al. DICER1 pleuropulmonary blastoma familial tumour predisposition syndrome: What the paediatric urologist needs to know. *J Pediatr Urol*. 2015. pii: S1477-5131(15)00352-6.
- Feng Y, Zou S, Weijdegård B, Chen J, Cong Q, Fernandez-Rodriguez J, et al. The onset of human ectopic pregnancy demonstrates a differential expression of miRNAs and their cognate targets in the Fallopian tube. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):64-79.
- Florio P, Severi FM, Bocchi C, Luisi S, Mazzini M, Danero S, et al. Single Serum Activin A Testing to Predict Ectopic Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(5):1748-53.
- Furlong LA. Ectopic pregnancy risk when contraception fails. A review. *J Reprod Med*. 2002;47(11):881-5.
- Fylstra DL. Tubal pregnancy: a review of current diagnosis and treatment. *Obstet Gynecol Surv*. 1998;53(5):320-8.
- Galliano D, Pellicer A. MicroRNA and implantation. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1531-44.
- Gemzell C, Guillome J, Wang CF. Ectopic pregnancy following treatment with human gonadotropins. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;143(7):761-5.
- Goldberg JM, Falcone T. Effect of diethylstilbestrol on reproductive function. *Fertil Steril*. 1999;72(1):1-7.
- González Manzanilla L, Cabrera Lozada C, Jiménez J, Grössl Melean J. Embarazo ectópico ovárico con dispositivo intrauterino in situ. Caso clínico. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2005;65(4):203-6.
- Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online*. 2007;15(6):728-39.
- Haider BA, Baras AS, McCall MN, Hertel JA, Cornish TC, Halushka MK. A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e89565.
- Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursors MicroRNA. *Mol Cell*. 2008;32(2):276-84.

- Hillis SD, Owens LM, Marchbanks PA, Amsterdam LF, Mac Kenzie WR. Recurrent chlamydial infections increase the risks of hospitalization for ectopic pregnancy and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176(1 Pt 1):103-7.
- Horne AW, Brown JK, Nio-Kobayashi J, Abidin HB, Adin ZE, Boswell L, et al. The association between smoking and ectopic pregnancy: why nicotine is BAD for your fallopian tube. *PLoS One.* 2014;9(2):e89400.
- Horne AW, Duncan WC, Critchley HO. The need for serum biomarker development for diagnosing and excluding tubal ectopic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(3):299-301
- Horne AW, King AE, Shaw E, McDonald SE, Williams AR, Saunders PT, et al. Attenuated sex steroid receptor expression in fallopian tube of women with ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):5146-54.
- Horne AW, van den Driesche S, King AE, Burgess S, Myers M, Ludlow H, et al. Endometrial inhibin/activin beta-B subunit expression is related to decidualization and is reduced in tubal ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(6):2375-82.
- Jansen RP. Endocrine response in the Fallopian tube. *Endocr Rev.* 1984;5(4):525-51.
- Kirk E, Papageorgiou AT, Calster BV, Condous G, Cowan N, Van Huffel S, et al. The use of serum inhibin A and activin A levels in predicting the outcome of “pregnancies of unknown location”. *Hum Reprod.* 2009;24(10):2451-6.
- Kotlabova K, Doucha J, Hromadnikova I. Placental-specific microRNA in maternal circulation - identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol.* 2011;89(2):185-91.
- Kurtoglu E, Kokcu A, Celik H, Kefeli M. Salpingitis isthmica nodosa and recurrent ectopic pregnancy. *J Obstet Gynaecol.* 2015;35(2):217-8.
- Kutluay L, Vicdan K, Turan C, Batioğlu S, Oğuz S, Gökmen O. Tubal histopathology in ectopic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1994;57(2):91-4.
- Laigaard J, Spencer K, Christiansen M, Cowans NJ, Larsen SO, Pedersen BN, et al. ADAM 12 as a first-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2006;26(10):973-9.
- Larsen WJ. *Embriología Humana.* 3ª Edición. Madrid: Elsevier; 2003.

- Lavy G, DeCherney AH. The hormonal basis of ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 1987;30(1):217-24.
- Lee DC, Romero R, Kim JS, Tarca AL, Montenegro D, Pineles BL, et al. miR-210 targets iron-sulfur cluster scaffold homologue in human trophoblast cell lines: siderosis of interstitial trophoblasts as a novel pathology of preterm preeclampsia and small-for-gestational-age pregnancies. *Am J Pathol.* 2011;179(2):590-602.
- Lee JK, Oh MJ; Shin JS, Lee KJ, Nam JH, Cha JH, et al. Clinical effectiveness of urinary human chorionic gonadotropin related protein (hCGRP) quantification for diagnosis of ectopic pregnancy. *J Korean Med Sci.* 2005;20(3):461-7.
- Leke RJ, Goyaux N, Matsuda T, Thonneau PF. Ectopic pregnancy in Africa: a population-based study. *Obstet Gynecol.* 2004;103(4):692-7.
- Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nat Commun.* 2012;3:688.
- Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics.* 2007;8:166.
- Lipscomb GH, Bran D, McCord ML, Portera JC, Ling FW. Analysis of three hundred fifteen ectopic pregnancies treated with single-dose methotrexate. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(6):1354-8.
- Lipscomb GH, McCord ML, Stovall TG, Huff G, Portera SG, Ling FW. Predictors of success of methotrexate treatment in women with tubal ectopic pregnancies. *N Engl J Med.* 1999;334(26):1974-8.
- López Sánchez C, García López V, Mijares J, Domínguez JA, Sánchez Margallo FM, Álvarez Migue IS, et al. Gastrulación: proceso clave en la formación de un nuevo organismo. *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2013;18(1).
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:6.
- Luo L, Ye G, Nadeem L, Fu G, Yang BB, Honarparvar E, et al. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 13):3124-32.

- Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, et al. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod.* 2009;81(4):717-29.
- Manfè V, Biskup E, Willumsgaard A, Skov AG, Palmieri D, Gasparini P, et al. cMyc/miR-125b-5p signalling determines sensitivity to bortezomib in preclinical model of cutaneous T-cell lymphomas. *PLoS One.* 2013;8(3):e59390.
- Mania-Pramanik J, Kerkar S, Sonawane S, Mehta P, Salvi V. Current Chlamydia trachomatis Infection, A Major Cause of Infertility. *J Reprod Infertil.* 2012;13(4):204-10.
- McBain JC, Evans JH, Pepperell RJ, Robinson HP, Smith MA, Brown JB. An unexpectedly high rate of ectopic pregnancy following the induction of ovulation with human pituitary and chorionic gonadotrophin. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87(1):5-9.
- Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, et al. Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W210-3.
- Menon S, Sammel MD, Vichnin M, Barnhart KT. Risk factors for ectopic pregnancy: a comparison between adults and adolescent women. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007;20(3):181-5.
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, et al. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem.* 2010;56(11):1767-71.
- Moini A, Hosseini R, Jahangiri N, Shiva M, Akhoond MR. Risk factors for ectopic pregnancy: A case-control study. *J Res Med Sci.* 2014;19(9):844-9.
- Mol BW, Lijmer JG, Ankum WM, van der Veen F, Bossuyt PM. The accuracy of single serum progesterone measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3220-7.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriología clínica.* 8.^a edición. Barcelona: Elsevier-Saunders; 2008.
- Morales Prieto DM, Markert UR. MicroRNAs in pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2011;88(2):106-11

- Moreno-Moya JM, Vilella F, Martínez S, Pellicer A, Simón C. The transcriptomic and proteomic effects of ectopic overexpression of miR-30d in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(6):550-66.
- Morse CB, Sammel MD, Shaunik A, Allen-Taylor L, Oberfoell NL, Takacs P, et al. Performance of hCG curves in women at risk for ectopic pregnancy: exceptions to the rules. *Fertil Steril.* 2012;97(1):101-6.
- Nama V, Manyonda I. Tubal ectopic pregnancy: diagnosis and management. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;279(4):443-53.
- Nazari A, Askari HA, Check JH, O'Shaughnessy A. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancy in in vitro fertilization. *Ferti Steril.* 1993;60(5):919-21.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1400-8.
- Ovejero Gómez VJ, Bermúdez García MV, Pérez Martín A, García Rodríguez J. Hemoperitoneo masivo asociado a embarazo ectópico: revisión de su manejo diagnóstico y tratamiento quirúrgico. *Semergen* 2011;37(9):514-18.
- Paltieli Y, Eibschitz I, Ziskind G, Ohel G, Silbermann M, Weichselbaum A. High progesterone levels and ciliary dysfunction-a possible cause of ectopic pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17(2):103-6.
- Pauerstein CJ: Clinical implication of oviductal physiology and biochemistry. *Gynecol Invest. Gynecol Invest.* 1975;6(3-4):253-64.
- Petraglia F. Inhibin, activin and follistatin in the human placenta – a new family of regulatory proteins. *Placenta.* 1997;18(1):3-8.
- Pisarska MD, Carson SA. Incidence and risk factors for ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 1999;42(1):2-8.
- Plaisier M, Dennert I, Rost E, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. *Hum Reprod.* 2009;24(1):185-97.
- Plaisier M, Rodrigues S, Willems F, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular

- endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first trimester decidual tissues. *Fertil Steril.* 2007;88(1):176-87.
- Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N. et al. Novel type of interstitial cell (Cajal –like) in human fallopian tube. *J Cell Mol Med.* 2005;9(2):479-523..
 - Professional and Public Relations Committee of the DESAD (Diethylstilbestrol and Adenosis) Project of the Division of Cancer Control and Rehabilitation. Exposure in utero to diethylstilbestrol and related synthetic hormones. Association with vaginal and cervical cancers and other abnormalities. *JAMA* 1976; 236(10):1107–1109.
 - Qavi AJ, Kindt JT, Bailey RC. Sizing up the future of microRNA analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2010;398(6):2535-49.
 - Rausch ME, Barnhart KT. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2012;55(2):418-23.
 - Refaat B, Simpson H, Britton E, Biswas J, Wells M, et al. Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? the role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation. *Fertil Steril.* 2012;97(5):1115-23.
 - Refaat B. Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:116.
 - Reis FM, D'Antona D, Petraglia F. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy. *Endocr Rev.* 2002;23(2):230-57.
 - Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AE, Devor E, Christenson L, Van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril.* 2013;99(3):855-861.
 - Rotas MA, Haberman S, Levгур M. Cesarean scar ectopic pregnancies: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol.* 2006;107(6):1373-81.
 - Rutter MM, Jha P, Schultz KA, Sheil A, Harris AK, Bauer AJ, et al. DICER1 Mutations and Differentiated Thyroid Carcinoma: Evidence of a Direct Association. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(1):1-5.
 - Sadler TW. *Embriología Médica de Langman.* 9ª Edición. Buenos Aires: Panamericana; 2004.

- Salih SM, Taylor HS. HOXA10 gene expression in human fallopian tube and ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(5):1404-6.
- Savaris RF, da Silva LC, Moraes Gda S, Edelweiss MI. Expresión of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril.* 2008;89(4):1015-7.
- Seeber BE, Barhart KT. Suspected Ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2006;107(2 Pt 1):399-413.
- Sha AG, Liu JL, Jiang XM, Ren JZ, Ma CH, Lei W, et al. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil Steril.* 2011;96(1):150-155.
- Shaw JL, Oliver E, Lee KF, Entrican G, Jabbour HN, Critchley HO, et al. Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChRalpha-7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2509-15.
- Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, et al. Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(8): 2607-2616.
- Sivalingam VN, Duncan WC, Kirk E, Shephard LA, Horne AW. Diagnosis and management of ectopic pregnancy. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2011;37(4):231-40.
- Sowter MC, Farquhar CM, Petrie KJ, Gudex G. A randomised trial comparing single dose systemic methotrexate and laparoscopic surgery for the treatment of unruptured tubal pregnancy. *BJOG.* 2001;108(2):192-203.
- Storeide O, Veholmen M, Eide M, Bergsjø P, Sandvei R. The incidence of ectopic pregnancy in Hordaland County, Norway 1976-1993. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997;76(4):345-9.
- Strandell A, Thorburn J, Hamberger L. Risk factors for ectopic pregnancy in assisted reproduction. *Fertil Steril.* 1999;71(2):282-6.
- Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev.* 2005;26(7):877-97.

- Swaminathan G, Martín-García J, Navas-Martín S. RNA viruses and microRNAs: challenging discoveries for the 21st century. *Physiol Genomics*. 2013;45(22):1035-48.
- Teixeira JLG, Rabaioli P, Savaris RF, Sensitivity and specificity of a urinary screening test used in an emergency setting to detect abnormal first trimester pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211.
- Tørring N, Ball S, Wright D, Sarkissian G, Guitton M, Darbouret B. First trimester screening for trisomy 21 in gestational week 8–10 by ADAM12-S as a maternal serum marker. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:129.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem*. 2006;140(1):13-21.
- Varma R, Gupta J. Tubal ectopic pregnancy. *BMJ Clin Evid*. 2009;2009. pii: 1406.
- Vasquez G, Winston RM, Brosens IA. Tubal mucosa and ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1983;90(5):468-74.
- Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martínez S, et al. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*. 2015;142(18):3210-21.
- Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008;320(5872):97-100.
- Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, et al. DIANA miRPath v.2.0: Investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W498-504.
- Wang L, Feng Y, Zou S, Brännström M, He L, Billig H, Shao R. Linking DNA methylation to the onset of human tubal ectopic pregnancy. *Am J Transl Res*. 2013;5(2):116-25.
- Wang Y, Chen J, Yang W, Mo F, Senz J, Yap D, et al. The oncogenic roles of DICER1 RNase IIIb domain mutations in ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *Neoplasia*. 2015;17(8):650-60.
- Weckstein LN. Current perspective on ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 1985;40(5):259-72.

- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
- Zhao Z, Zhao Q, Warrick J, Lockwood CM, Woodworth A, Moley KH, et al. Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem.* 2012;58(5):896-905.
- Zhou J, Shao G, Chen X, Yang X, Huang X, Peng P, et al. MicroRNA 206 and MicroRNA 574-5p are highly expression in Coronary Artery Disease. *Biosci Rep.* 2015. pii: BSR20150206.

ANEXO I: INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACION CLINICA A LA PACIENTE

Análisis del perfil de expresión de miRNAs en tejido embrionario sano y ectópico

Iniciales de la paciente: _____

Nº de paciente: _____

Nombre del Investigador Principal:

Teresa Lozoya Araque.

Servicio de Ginecología y Obstetricia.

Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Contacto: 961244000, ext 245063. 3ª Planta torre F cara norte. Administración clínica.

METODOLOGIA: DESCRIPCION Y PROPOSITO DEL ESTUDIO

Se le ha propuesto que participe en un estudio piloto para la determinación de microRNAs en las placentas a lo largo del embarazo.

Los microRNAs son unas sustancias que se cree puedan estar asociadas con la implantación del saco gestacional en el interior del útero durante las primeras semanas de gestación.

El propósito de este estudio es determinar los niveles de las sustancias explicadas anteriormente (microRNAs) a lo largo del embarazo tanto en tejido placentario y compararlos con pacientes que tienen algún tipo de alteración de la implantación, como son mujeres con gestaciones ectópicas, que son aquellas en las que el saco gestacional está fuera del útero.

Con el fin de que pueda decidir si desea participar en este estudio, usted debe comprender las ventajas e inconvenientes del mismo para que sea capaz de tomar una decisión informada al respecto. Este proceso es lo que se conoce como consentimiento informado.

Este consentimiento informado le da información detallada sobre el estudio y además, su médico comentará esta información con usted. Cuando haya comprendido el estudio se le solicitará que firme este consentimiento informado si desea participar en él. Se le dará una copia de este documento para que pueda guardarlo.

Su participación en este estudio es voluntaria.

Antes del estudio:

Su doctor le informará del estudio y si desea participar en él. El hecho de participar supone que acepta donar un pequeño fragmento de placenta (2cm) de su gestación. Las placentas actualmente no tienen ningún destino específico, siendo finalmente incineradas. La placenta sólo va a ser utilizada para estudiar sus características morfológicas y de expresión génica. En ningún caso va a ser empleada para cultivo y, bajo ningún concepto, para ser trasplantada a otras personas. Tampoco va a ser utilizadas con carácter comercial o lucrativo.

La posibilidad de que usted done la placenta se ampara en la Ley 42/1988, de 28 de diciembre, sobre donación y utilización de embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos u órganos.

No existen contraindicaciones para participar en este estudio, únicamente que se trate de gestaciones sin patología o gestaciones ectópicas.

Si participa en el estudio:

Se recogerá el fragmento de placenta necesario para el estudio (2cm), y el resto seguirá su curso normal, bien envió a anatomía patológica o bien se desechará. El embrión, feto o recién nacido no será manipulado en ningún momento.

RIESGO ASOCIADO AL ESTUDIO

No existe ningún riesgo asociado al estudio.

Nueva información:

Si se comunica cualquier nueva información que pudiera afectar su participación en el estudio se le notificará por su médico.

BENEFICIOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Su participación en el estudio puede ayudar a determinar nuevos marcadores tisulares de placentación anómala que ayuden a clarificar la fisiopatología y posiblemente el diagnóstico de determinadas patologías de la implantación.

Puede solicitar al investigador una mayor información acerca del estudio

CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal, siendo el responsable del Registro la Consellería de Sanidad.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio / colaboradores podrán relacionar dichos datos con Usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones¹, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio / colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país.

DERECHO A PREGUNTAR SOBRE EL ESTUDIO Y A ABANDONARLO

Si tiene cualquier pregunta relativa al estudio o a sus derechos como paciente, contacte al Dr. Teresa Lozoya en Administración clínica torre F tercera planta cara norte, la Fe Bulevar sur.

Tiene el derecho de abandonar el estudio en cualquier momento, sin que por ello se

1

altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su tratamiento. Le será comunicada cualquier nueva información que pueda afectar a su buena disposición para continuar su participación en el estudio.

COSTES

Usted no cobrará cantidad alguna por participar en este estudio.

MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Nº de paciente

TITULO DEL ESTUDIO:

“Análisis del perfil de expresión de miRNAs en tejido embrionario sano y ectópico”

Yo _____ (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la dra. Teresa Lozoya Araque. Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del participante

Firma del Investigador

Fecha:

Fecha: