

# DESCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL SISTEMA LIN28/LET-7 Y MICRORNAS ASOCIADOS EN TEJIDO PLACENTARIO SANO Y TEJIDO PLACENTARIO PROCEDENTE DE EMBARAZO ECTÓPICO



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA I CIRUGÍA

---

## **Olivia Vega Oomen**

Licenciada en Medicina

Especialista en Obstetricia y Ginecología

### **DIRECTORES:**

Prof. Antonio Pellicer Martínez

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Prof. Manuel Tena Sempere

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de Doctorado 3042 Medicina

Valencia, 2017



# DESCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL SISTEMA LIN28/LET-7 Y MICRORNAS ASOCIADOS EN TEJIDO PLACENTARIO SANO Y TEJIDO PLACENTARIO PROCEDENTE DE EMBARAZO ECTÓPICO

**Olivia Vega Oomen**

Licenciada en Medicina

Especialista en Obstetricia y Ginecología

## **DIRECTORES:**

Prof. Antonio Pellicer Martínez

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Prof. Manuel Tena Sempere

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de Doctorado 3042 Medicina

---



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA I CIRUGÍA





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**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, así como Jefe de Servicio del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Descripción y comparación del perfil de expresión del sistema LIN28/let-7 y microRNAs asociados en tejido placentario sano y tejido placentario procedente de embarazo ectópico**” ha sido realizado íntegramente por Doña Olivia Vega Oomen 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 7 de febrero de 2017.

Fdo. Prof. Antonio Pellicer Martínez



**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: “**Descripción y comparación del perfil de expresión del sistema LIN28/let-7 y microRNAs asociados en tejido placentario sano y tejido placentario procedente de embarazo ectópico**” ha sido realizado íntegramente por Doña Olivia Vega Oomen 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 7 Febrero de 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. Domínguez', is positioned below the text of the certification.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**Prof. Manuel Tena Sempere**, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Córdoba, Subdirector Científico del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) e Investigador del Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) del Instituto de Salud Carlos III,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Descripción y comparación del perfil de expresión del sistema LIN28/let-7 y microRNAs asociados en tejido placentario sano y tejido placentario procedente de embarazo ectópico**” ha sido realizado íntegramente por Doña Olivia Vega Oomen 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

Córdoba, a 07 de Febrero de 2017.

Fdo. Prof. Manuel Tena Sempere

---

## *AGRADECIMIENTOS*

---

Me resulta difícil expresar en estas líneas, mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible con su apoyo que este proyecto de investigación vea la luz.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis su gran ayuda. Profesor Antonio Pellicer mi más sincero agradecimiento por haber orquestado todo este maravilloso trabajo y ser capaz de hacerme entender la importante relación entre la clínica y el papel de la investigación. Al Dr. Francisco Domínguez por su ayuda inestimable, por estar siempre dispuesto a echar una mano y por hacerme encontrar una salida en los malos momentos. Al Dr. Manuel Tena por transmitirme todos sus conocimientos sobre el infinito y maravilloso campo de la fisiología.

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, gráficos... me han hecho la vida más fácil.

No hay palabras suficientes para mostrar mi gran cariño, afecto y la gran valía profesional de Teresa Lozoya. Gracias por haber hecho tan fácil y cómodo el trabajar juntas.

Gracias tanto a todo el personal de la Fundación IVI como al del Hospital La Fe, por permitir que esta Tesis haya sido posible.

Mi más sincero reconocimiento a todas esas mujeres, que de forma totalmente altruista y desinteresada, han participado en este proyecto.

Merecen también un enorme reconocimiento mis compañeros de fatiga del Hospital, en especial a mi guardia, que han sido mi familia en la Fe enseñándome todo lo que sé. Agradecerles su paciencia y ayuda en esta labor, pensando siempre en mí ante un posible caso para el trabajo. Gracias amigos.



A las Carolinas, Reich, Bety, Tami, March, Patry, Yure, Mery, Janet, Zai, Ana, Iba y Marian por ser tan geniales y tan buenas amigas.

A mi familia se lo debo todo. A mis padres, por ser ese apoyo constante, por ver lo mejor de mí y ser la brújula que guía mis pasos. 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. En especial quiero dedicárselo a mi madre, para que sepa que hoy y siempre lucharemos juntos contra esa dichosa enfermedad. A mi hermana, mi hermanita Linda, ser mi compañera de risas y anécdotas y sobre todo por ser mi amiga. Sé que siempre tendré un apoyo en ti y tú lo tendrás conmigo. Me siento orgullosa de ser parte de esta estupenda familia.

Gracias Ale, por entenderme y creer en mí. Por actuar de compañero de vida. Nadie mejor que tú entiende mis dudas, inquietudes o un mal día.

De nuevo, gracias a todos.

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

---

## *LISTADO DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS*

---

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**ANG1 y ANG2:** angiotensinas tipo 1 y 2

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**βhCG:** beta subunit human corionic gonadotropin ( subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana)

**CCR2 y CCR5:** chemokine receptor type 2 and type 5 (receptores de quimoquinas tipo 2 y tipo 5)

**CDK 4:** cyclin dependent quinase type 4 (quinasa dependiente de ciclina tipo 4)

**°C:** grado centígrado

**Cm:** centímetro

**COX- 2:** ciclooxigenasa tipo 2

**DEPC:** dietil pirocarbonato

**DIU:** dispositivo intrauterino

**EE:** embarazo ectópico

**Endobag:** bolsa de extracción laparoscópica

**EPI:** enfermedad pélvica inflamatoria

**FID:** fosa iliaca derecha

**FIV:** fecundación in vitro

**GLD:** gestación de localización desconocida

**GOT:** glutamic-oxaloacetic transaminase (transaminasa glutámico-oxaloacética)

**hCG:** human corionic gonadotropin (gonadotropina coriónica humana)

**IC:** intervalo de confianza

**IGF 2:** insulin growth factor type 2 (factor de crecimiento insulínico tipo 2 )

**IL 1, IL6 y 8:** Interlequinas tipo 1, 6 y 8

**IVE:** interrupción voluntaria del embarazo

**MEC:** Matriz extracelular

**MCPI:** mitochondrial pyruvate carrier (transportador mitocondrial del piruvato)

**µl:** microlitro

**miRNAs:** micro ácidos ribonucleicos

**min:** minutos

**mm:** milímetros

**mUI/mL:** miliunidades/ mililitro

**ncRNA:** non-coding *RNA*

**nmol/L:** nanomol por litro

**Nt:** nucleótidos

**PAAP-A:** proteína A plasmática asociada a la gestación

**PCR:** polymerase chain reaction (reacción en cadena de polimerasa)

**pg/mL:** picogramos por mililitro

**qPCR:** quantitative polymerase chain reaction or real time PCR (reacción en cadena de polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real)

**TGF:** transforming growth factor beta (factor de crecimiento transformante beta)

**TNF $\alpha$ :** tumoral necrosis factor alfa (factor de necrosis tumoral alfa)

**RNA:** ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

**r.p.m:** revoluciones por minuto

**RT:** reverse transcription (retro transcripción)

**RT-PCR:** Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

**SEM:** standard error of the mean (error standard de la media)

**UTR:** untranslated region (region no traducida de un gen)

**VEGF:** vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular)

---

## *ANGLICISMOS*

---

**Array de proteínas:** Matriz bidimensional de soporte sólido en las que están unidos anticuerpos que detectan específicamente determinadas proteínas.

**Cluster de genes:** parte de una familia de genes. Es un grupo de dos o más genes que se encuentran en el ADN de un organismo que codifican para polipéptidos similares o proteínas, que comparten colectivamente una función generalizada y con frecuencia se encuentran dentro de unos pocos miles de pares de bases de la otra.

**Forward:** secuencia del primer 5'-3' que se une en la cadena que va en dirección 3'-5' del ADN.

**Hatching:** la salida de la zona pelúcida del embrión o eclosión embrionaria.

**Housekeeping:** hace referencia a un gen reportero.

**In vivo:** En el cuerpo. Conjunto de experimentos y de fenómenos observados que se efectúan directamente sobre el organismo vivo.

**In vitro:** Conjunto de fenómenos observados en el laboratorio, investigando y manipulando fuera del organismo vivo.

**Primer:** cebador. Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

**RNA binding protein:** proteínas de unión a ácidos ribonucleicos.

**Reverse:** secuencia del primer 3'-5' que se une en la cadena que va dirección 5'-3' del ADN.

---

## ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. GENERALIDADES SOBRE EL EMBARAZO NORMAL .....	2
1.1.1. Implantación .....	2
1.1.2. Funciones de la placenta.....	5
1.2. GENERALIDADES SOBRE EL EMBARAZO ECTÓPICO.....	7
1.2.1. Concepto de embarazo ectópico y sus lugares de asentamiento habituales.....	7
1.2.2. Epidemiología del embarazo ectópico.....	8
1.2.3. Fisiopatología.....	9
1.2.4. Factores de riesgo .....	10
1.2.5. Clínica y diagnóstico diferencial.....	11
1.2.6. Diagnóstico.....	12
1.2.7. Tratamiento del embarazo ectópico.....	22
1.3. MICRORNAs .....	26
1.3.1. ¿Qué es un microRNA? .....	26
1.3.2. Papel de los microRNAs en la implantación.....	28
1.3.3. Papel de los microRNAs en la placenta.....	30
1.3.4. MicroRNAs circulantes durante la gestación.....	31
1.3.5. MicroRNAs relacionados con el embarazo ectópico.....	32
1.3.6. Complejo LIN28B /Let7.....	34
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1. APROBACIÓN DEL ESTUDIO POR EL COMITÉ ÉTICO.....	42
4.2. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	42
4.2.1. Casos: criterios de inclusión.....	43
4.2.2. Casos: criterios de exclusión controles: criterios de	

exclusión.....	44
4.2.3. Controles: criterios de inclusión.....	44
4.2.4. Controles: criterios de exclusión.....	44
4.3. RECOGIDA, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	45
4.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.....	46
4.4.1. Aislamiento de ARN.....	46
4.4.2. Retrotranscripción y amplificación de rnas mensajeros por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR) o cuantitativa.....	46
4.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR) o cuantitativa.....	48
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	51
5.2. EXPRESIÓN DE LIN28B Y MIRNAS RELACIONADOS EN TEJIDO PLACENTARIO DURANTE GESTACIONES HUMANAS NORMALES EN ESTADÍOS PRECOCES .....	52
5.3. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE LIN28B Y MIRNAS RELACIONADOS EN EL TEJIDO PLACENTARIO DE EMBARAZOS ECTÓPICOS Y DE GESTACIONES HUMANAS NORMALES PRECOCES.....	58
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>88</b>



---

## *ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS*

---

Tabla 1.....	11
Tabla 2.....	19
Tabla 3.....	24
Tabla 4.....	47
Tabla 5.....	51
Tabla 6.....	51
Figura 1.....	3
Figura 2.....	7
Figura 3.....	8
Figura 4.....	15
Figura 5.....	16
Figura 6.....	17
Figura 7.....	23
Figura 8.....	27
Figura 9.....	30
Figura 10.....	36
Figura 11.....	43
Figura 12.....	53
Figura 13.....	54
Figura 14.....	55
Figura 15.....	56
Figura 16.....	57
Figura 17.....	59
Figura 18.....	59
Figura 19.....	60
Figura 20.....	60
Figura 21.....	61

**01**

---

# INTRODUCCIÓN

### 1.1. GENERALIDADES SOBRE EL EMBARAZO NORMAL

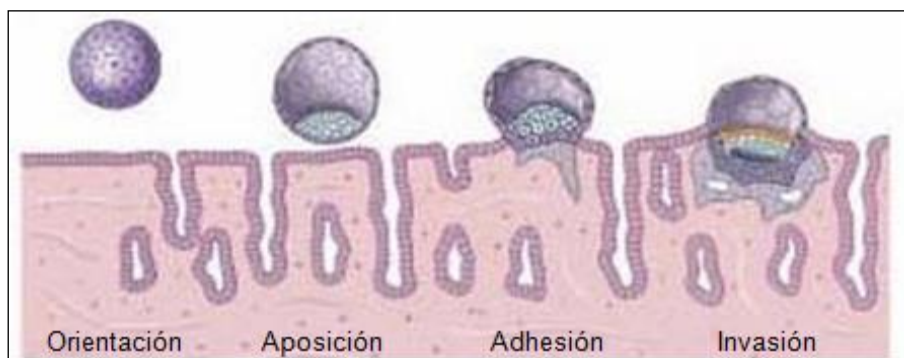
#### 1.1.1. IMPLANTACIÓN

Tras la fecundación en la porción ampular de la trompa, el cigoto permanece en esta zona unas 72 horas (Croxatto HB y cols., 1978). Durante este periodo experimenta los procesos de división celular y compactación para formar la mórula. Debido a la influencia de los esteroides ováricos, del sistema nervioso autónomo y del embrión mismo, la mórula es transportada a través del istmo y la porción intersticial de la trompa a la cavidad uterina (Croxatto HB, 1978). La progesterona incrementa la frecuencia de las contracciones musculares y la gonadotropina coriónica humana (hCG) liberada por el embrión temprano puede inducir la expresión de ARNm de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en el epitelio tubárico, lo cual puede elevar la concentración de prostaciclina, que favorecería la apertura de los esfínteres tubáricos.

Después de la entrada de la mórula en la cavidad uterina (cuatro días después de la fertilización), se establece la polaridad celular y con ello ocurre la diferenciación del linaje celular para formar un blastocisto. El blastocisto empieza a expresar y transcribir más de 500 genes previamente inactivos, y es activado para liberarse de la zona pelúcida, 72 horas después de entrar a la cavidad uterina. La salida de la zona pelúcida o eclosión (*hatching*) se produce, por la presión hidrostática producida por el blastocisto en expansión, y a la acción de las enzimas proteolíticas liberadas por el blastocisto (tripsina) y el endometrio (triptasa) que destruyen la zona pelúcida (Perona RM WP, 1986; Lee DR LJ y cols., 1997; O'Sullivan CM UJ y cols., 2004), con lo que se forma un pequeño orificio en el polo embrionario de la zona pelúcida, por donde el blastocisto escapa e inicia el proceso de implantación (Sawada H YK y cols., 1990). La hCG liberada por el blastocisto y las citocinas liberadas por el blastocisto y el endometrio inician el proceso de señalamiento esencial para la implantación. Coincidentemente, los esteroides ováricos preparan al útero para la implantación. El incremento preovulatorio en la secreción de  $17\beta$ -estradiol estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales endometriales. El marcado incremento en la producción de progesterona, después de la ovulación, causa edema del estroma endometrial, lo que produce el cierre efectivo de la luz de la cavidad uterina y permite que el blastocisto se mantenga en íntimo contacto con el epitelio endometrial.

La implantación se inicia seis a siete días después de la fertilización (Vigano P y cols., 2003). El blastocisto solo puede unirse al endometrio durante una “ventana crítica de implantación”, que corresponde al periodo de los días 19 a 24 del ciclo menstrual. Este proceso es clave en el establecimiento de un embarazo exitoso. En la especie humana, en condiciones naturales sólo el 35% de los embriones consiguen implantar, es decir, fisiológicamente sólo 1/3 de los ciclos considerados fértiles acaban en embarazo. Las causas de esta baja tasa de éxito se comparten entre el embrión (ya que in vivo el 30% de los blastocistos son morfológicamente anómalos), el útero (alteraciones endocavitarias como los pólipos, tabiques o adherencias; escasa proliferación endometrial) y un diálogo defectuoso entre el embrión y el endometrio materno, que se puede objetivar por la existencia de un 30% de pérdidas gestacionales precoces antes del momento de la menstruación. Este porcentaje de pérdidas es aún mayor en pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida (Simón y cols., 1999). En este sentido, se comprobó que en casos de fecundación in vitro (FIV) y de donación de ovocitos las pérdidas embrionarias precoces suponían un 43% y 38%, respectivamente (Simón y cols., 1999). Todo ello supone que la alteración endometrial propia de los tratamientos farmacológicos utilizados, junto con la mayor incidencia de alteraciones cromosómicas embrionarias afectaría la correcta implantación.

La implantación embrionaria no es un hecho puntual, sino que se trata de un proceso que consta de tres fases consecutivas y diferenciadas (Figura 1).



**Figura 1. Fases del proceso de implantación.** En primer lugar el embrión se orienta y se aposiciona, hacia una zona determinada de la superficie luminal de la cavidad endometrial donde posteriormente se fijará. En la fase de adhesión, el trofoectodermo del blastocisto contacta directamente con el epitelio endometrial y, en la invasión, el embrión induce la rotura de la membrana epitelial y penetra en el estroma endometrial decidualizado.

#### *1.1.1.1. FASE DE APOSICIÓN*

La fase de aposición u orientación es la menos estudiada y tiene lugar entre los días 5 y 6 postovulación, cuando el blastocisto tiene un tamaño aproximado de 100 µm de diámetro y ha eclosionado. En seres humanos el blastocisto se posiciona en el fundus uterino y el tercio superior de la cara posterior uterina. Esto es importante porque va a determinar la localización de la placenta. El disco embrionario (masa celular interna), que dará origen al embrión propiamente dicho, también se posiciona en un lugar específico según la especie.

Se desconoce todavía cómo el blastocisto llega a su lugar final de implantación, pero se cree que puede estar relacionado con la presencia de receptores de quimoquinas en su superficie como el CCR2 (receptor de MCP-1) o CCR5 (receptor de RANTES) (Domínguez y cols., 2003) y puesto que el endometrio secreta multitud de quimoquinas en el momento de la implantación (Paria y cols., 2002), se piensa que el blastocisto podría ser atraído por estas quimoquinas hacia el sitio de implantación (Domínguez y cols., 2005).

#### *1.1.1.2. FASE DE ADHESIÓN*

En el proceso de implantación, la fase de adhesión es el resultado de los cambios morfológicos y moleculares en la superficie del trofoblasto y del endometrio. Es particularmente interesante porque están implicadas la unión de dos organismos que son genética e inmunológicamente distintos, concretamente de las superficies apicales de sus epitelios (endometrial y trofoectodermo) (Enders, 1994). Dicha adhesión está mediada por la inducción esteroidea (Aplin, 1997) y/o embrionaria (Simón y cols., 1998) de moléculas de adhesión en la superficie celular del epitelio luminal durante la ventana de implantación.

Las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión célula-célula y en la adhesión célula-matriz extracelular son cruciales para la unión del blastocisto al endometrio materno. Así pues, estas primeras interacciones que mencionábamos anteriormente podrían venir seguidas de eventos de adhesión mediados por integrinas, cadherinas y selectinas (Domínguez y cols., 2005; Genbacev, 2003). La expresión de las cadherinas y selectinas también ha sido descrita en el epitelio endometrial y en el trofoblasto (MacMalman y cols., 1996). Una de las selectinas descritas como fundamentales para el proceso de implantación es la L-selectina. La existencia de sus ligandos en el endometrio ha sido demostrada, así como la existencia de L-selectina en células trofoblásticas del embrión humano (Genbacev, 2003). Entre las moléculas de adhesión más

relevantes en el proceso de implantación se encuentran las integrinas implicadas en la fase de adhesión, como la integrina  $\beta 3$ , cuya expresión se ve reducida en mujeres infértiles (Lessey y cols., 1994; González y cols., 2000). Además, el blastocisto es capaz de aumentar selectivamente la expresión de esta molécula a través del sistema de la interleuquina 1 (IL-1) (Simón y cols., 1994).

### *1.1.1.3. FASE DE INVASIÓN*

El siguiente paso es la penetración del blastocisto a través del epitelio endometrial y la invasión del estroma por parte del trofoblasto. En la especie humana, el blastocisto se adhiere a la capa del epitelio endometrial comenzando un proceso llamado expansión del trofoblasto que es inducido por una reacción apoptótica paracrina mediada por el sistema Fas-Fas ligando (Galán y cols., 2000) que permite al blastocisto atravesar la barrera epitelial. Posteriormente, el blastocisto se embebe en el estroma y el sitio de entrada en el epitelio es rápidamente cubierto por fibrina, sobre la cual las células epiteliales inician un proceso de cierre mediante migración/proliferación celular con el fin de sellar la superficie epitelial (Aplin, 2007). Este mecanismo es clave para proteger al endometrio de la entrada de patógenos, así como para que comience la invasión a través del estroma y tenga lugar una placentación adecuada.

En la especie humana, la placentación es hemocorial, para ello el trofoblasto invadirá el estroma y formará las vellosidades coriales en contacto con las lagunas de sangre maternas, garantizándose la supervivencia fetal. Este proceso necesita una regulación muy precisa para prevenir posibles invasiones patológicas por exceso, como ocurre en los casos de placenta ácreta o, por defecto, como es el caso de la preeclampsia. El control de este proceso invasivo es mediado por diversas proteasas que degradan la IL-1, entre ellas las serinproteasas, metaloproteasas y collagenasas.

### *1.1.2. FUNCIONES DE LA PLACENTA*

La placenta es el elemento esencial en la determinación de la interfase materno-fetal responsable del adecuado intercambio de oxígeno, nutrientes y productos de desecho durante la gestación (Murphy, VE y cols, 2006; Reis, FM y cols, 2002; Straszewski-Chavez, S.L y cols., 2005). La placenta, como órgano específico del embarazo, experimenta cambios estructurales y

funcionales dramáticos durante su desarrollo. Estos cambios, que son indispensables para un correcto desarrollo fetal, son controlados por diversos mecanismos de regulación, cuya naturaleza no ha sido completamente aclarada. En este sentido, evidencias obtenidas por diversos grupos de investigación han permitido la identificación de la expresión de miRNAs específicos en placenta, así como de cambios en sus niveles relativos en determinadas patologías gestacionales (Prieto y cols., 2011; Reid y cols., 2011). Todo ello sugiere la posible participación de sistemas de regulación por miRNAs en diversos aspectos del desarrollo y/o la función placentaria, cuyas implicaciones fisiológicas, fisiopatológicas y/o diagnósticas no están aun suficientemente aclaradas.

Además de sus funciones vasculares y de intercambio materno-fetal, la placenta posee una intensa actividad hormonal, con la producción de diversas señales endocrinas que son esenciales tanto en el desarrollo del feto como en las adaptaciones maternas durante la gestación (Murphy y cols., 2006). Así, la placenta humana produce estrógenos, progesterona, hCG y lactógeno placentario, entre otras; la determinación de algunos de estos factores es la base para el diagnóstico de la gestación y de algunas de sus posibles complicaciones (Reis, 2002). Al igual que con los mecanismos implicados en la regulación de la invasión trofoblástica, los sistemas responsables del control preciso de la secreción hormonal por la placenta han sido escasamente caracterizados hasta la fecha.

Situaciones adversas durante la gestación, producidas por alteraciones en el ambiente fetal y/o materno, así como por malformaciones fetales o de la propia placenta, tienen un marcado impacto sobre los diversos aspectos del desarrollo y la función placentaria arriba indicados. Todo ello compromete la capacidad de desarrollar una gestación a término saludable y pueden perturbar seriamente la fertilidad. Dichas alteraciones pueden traducirse en cambios en diversos marcadores tanto tisulares como circulantes, relacionados con los fenómenos de desarrollo trofoblástico y función endocrina antes apuntados (Reis, F.M, 2002; Straszewski-Chavez, S.L y cols., 2005). Además de su marcado interés fisiopatológico, la detección de dichas alteraciones, especialmente en etapas precoces de la gestación, posee un marcado valor pronóstico y diagnóstico, que ha intentado ser explotado con éxito variable mediante la identificación de diversos marcadores de riesgo gestacional asociado a patologías tales como la preclampsia, el retraso de crecimiento intrauterino, el aborto de repetición, el embarazo ectópico y ciertas aneuploidías.

## 1.2. GENERALIDADES SOBRE EL EMBARAZO ECTÓPICO

### 1.2.1. CONCEPTO DE EMBARAZO ECTÓPICO Y SUS LUGARES DE ASENTAMIENTO HABITUALES

El embarazo ectópico (EE) es una complicación precoz de la gestación en la cual un óvulo fecundado se implanta en un sitio distinto al endometrio de la cavidad uterina. Dicha implantación puede ocurrir en cualquier lugar del tracto genital femenino (figuras 2 y 3), incluso externamente a este, siendo el lugar más frecuente la trompa de Falopio (95-98%) (Domínguez y cols., 2014). El EE puede anidar en las distintas partes de la trompa (Pisarka y cols., 1998; Molinaro y cols., 2007; Farquhar, 2005). En función de esto se puede clasificar en distintos tipos. El EE ampular es aquel que afecta a la ampolla, que es la parte más ancha y más larga, con 2/3 aproximadamente de la longitud total de la trompa. Supone el 85% de los casos. En esta localización, el EE puede evolucionar hacia la resolución espontánea por reabsorción, presentar aborto tubárico o permitir el crecimiento del embrión y terminar en ruptura de la trompa (Figura 2B). El segundo lugar más frecuente es el itsmo (13% de los casos), que es la zona más estrecha de la trompa, lo cual deriva en rupturas más tempranas (Figura 2C). El EE intersticial o intramural sólo constituye el 2% de los casos (Figura 2D) y el infundibular, en el que la anidación sucede cerca de las fimbrias, es extraordinario (Figura 2A) (Vargas, 2013).

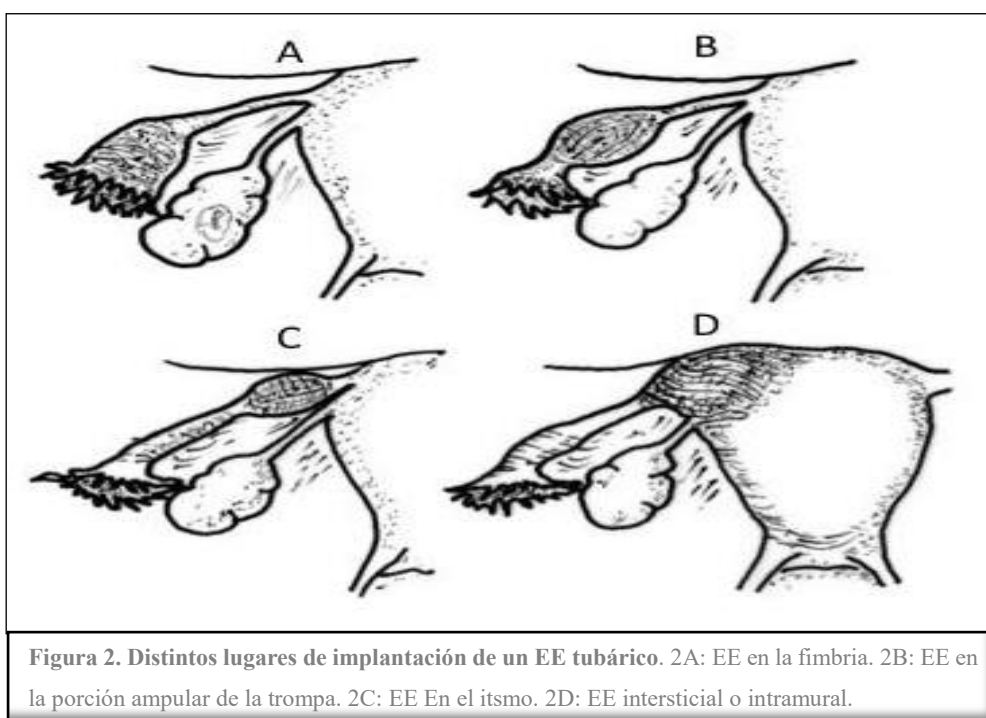


Figura 2. Distintos lugares de implantación de un EE tubárico. 2A: EE en la fimbria. 2B: EE en la porción ampular de la trompa. 2C: EE En el itsmo. 2D: EE intersticial o intramural.



Otros lugares de implantación del EE son (figura 3): el ovario (0,5-3%), el cuello del útero (1%), los cuernos uterinos (2-3%) (Larraín D y cols., 2011), las cicatrices uterinas por cirugías previas (6%) (Rotas MA y cols., 2006) o extraordinariamente la cavidad abdominal. También existen casos de una gestación intrauterina coincidente con una extrauterina (heterotópica); aunque son muy raros, su incidencia está aumentando por el creciente uso de técnicas de reproducción asistida.

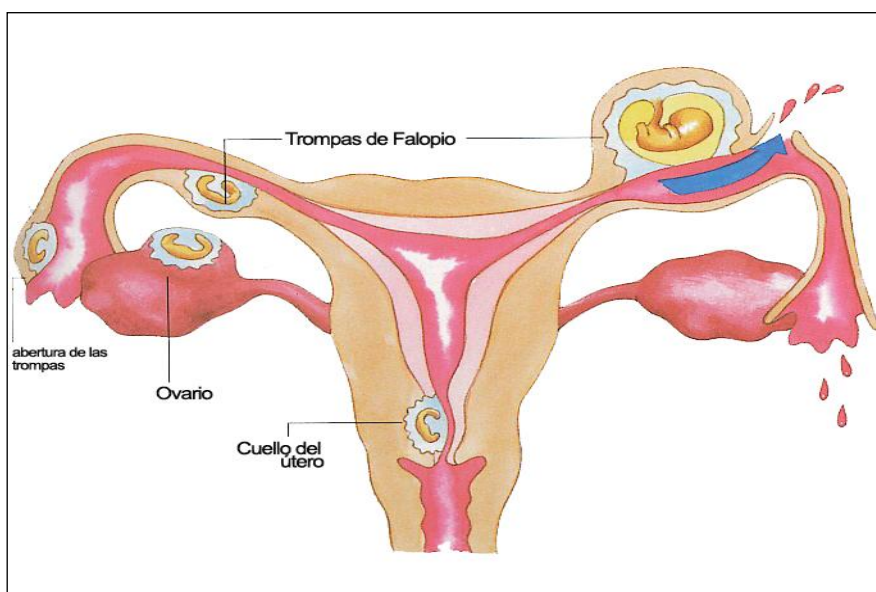


Figura 3. Distintos lugares de asentamiento del embarazo ectópico.

### 1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL EMBARAZO ECTÓPICO

La incidencia del EE resulta variable en la literatura médica, oscilando entre el 0,6 y el 2% de los embarazos documentados, presentándose con picos más altos en la adolescencia (Menon y cols., 2007; Marion y Meeks, 2012). Entre las mujeres que consultan en urgencias por metrorragia del tercer trimestre asociada a dolor suponen hasta un 16 % de los casos (Murray y cols., 2005)

La incidencia global ha aumentado desde mediados del siglo veinte, alcanzando a principios de los años noventa una cifra aproximada de 20 por 1000 embarazos (Bouyer y cols.,

2003), lo cual se relaciona con el aumento de la prevalencia infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* y gonococo, y el uso creciente de técnicas de reproducción asistida (Kamwendo y cols., 2000).

El embarazo ectópico continúa siendo la principal causa de muerte materna en las primeras etapas de la gestación (4-10% de las muertes relacionadas con el embarazo en países desarrollados) y una de las urgencias quirúrgicas más frecuentes del primer trimestre (Farquhar y cols., 2005; Qi y cols., 2012). En todo caso, las tasas de mortalidad materna absoluta y relativa causadas por el EE han ido descendiendo en los países desarrollados a lo largo de los dos últimos decenios, pasando de 35 muertes por 10000 casos de EE en 1970 a 4,2 muertes por 10000 casos en 1985 (Creanga y cols., 2011). Esto se debe al desarrollo tecnológico alcanzado en los siglos XX y XXI que permiten el diagnóstico y tratamiento antes de la ruptura del EE. Sin embargo, en países subdesarrollados la mortalidad es hasta 10 veces superior (10-30%) debido a que la escasez de recursos deriva en un diagnóstico tardío, lo que conduce en casi todos los casos a complicaciones importantes e intervenciones quirúrgicas de emergencia (Farquhar y cols., 2005; Qi y cols., 2012).

El EE no es solo una causa importante de morbilidad y mortalidad asociada con el riesgo de ruptura y hemorragia intraabdominal, sino que puede generar secuelas graves en la vida reproductiva femenina, incluyendo el embarazo ectópico recurrente y la infertilidad (Farquhar y cols., 2005; Rana y cols., 2013).

### 1.2.3. FISIOPATOLOGÍA

En el embarazo ectópico, la fecundación del óvulo se produce correctamente en el tercio externo de la trompa de Falopio y es durante la migración del óvulo ya fecundado donde aparece alguna circunstancia, desde destrucción anatómica e histológica de las trompas de Falopio, desequilibrios hormonales, aberraciones de la motilidad tubárica, obstrucción o estrechez de la luz de la trompa (Shaw y cols., 2010; Brown y Horne, 2011), a factores embrionarios como la existencia de una translocación, que se traducen en una implantación prematura antes de alcanzar la cavidad uterina (Altunaga y cols., 2011).

El trofoblasto del EE es similar al del embarazo normal y secreta gonadotropina coriónica humana (hGC), con mantenimiento del cuerpo lúteo del embarazo que produce estrógenos y progesterona suficientes para inducir los cambios maternos de la primera fase del embarazo. Esto

permite que en las primeras semanas la evolución sea asintomática, pues la fecundación, como hemos señalado anteriormente es completamente normal; la disrupción que ocurre es que la implantación del cigoto sucede en un sitio impropio. Muy pronto, ante una la barrera decidual escasa y el poder erosivo del trofoblasto, el huevo va a ser inviable.

#### 1.2.4. FACTORES DE RIESGO

La incidencia del embarazo ectópico se incrementa con la presencia aquellos factores de riesgo que lesionan la trompa y alteran el transporte del embrión hasta el útero. En casos de cirugía tubárica previa como la esterilización, el fracaso de la técnica ocurre en un 0,1-0,8 % de los casos y de estos embarazos, un tercio serán EE (Peterson y cols., 1997). En cuanto a la cirugía reconstructiva de las trompas (salpingostomía y reanastomosis tubárica) el riesgo de un EE posterior oscila entre 5-18%, lo cual va a depender del daño tubárico residual, del tipo de cirugía y de la experiencia del cirujano (Mark y Rock, 2006). Las mujeres que han tenido previamente un EE tienen un riesgo superior al 10% de padecer un nuevo embarazo ectópico (Ovejero y cols., 2011). También, multiplica el riesgo de una gestación ectópica hasta ocho veces, la exposición intraútero de dietilbestrol. Esto es debido a que estas pacientes presentan anomalías en la morfología de la trompa y en la función de las fimbrias (Goldberg y Falcone, 1999). En las mujeres portadoras de un dispositivo intrauterino (DIU) si existe un fallo de su función anticonceptiva, se incrementa la posibilidad de que el embarazo sea de localización ectópica, debido a que el dispositivo previene más efectivamente el embarazo intrauterino que la implantación extrauterina (1 de cada dos gestaciones con DIU de levonorgestrel y 1 de cada 16 con DIU de cobre) (Backman y cols., 2004; Furlong, 2002). En los casos de infertilidad la incidencia de EE también es claramente mayor, puesto que asocian con más frecuencia anomalías tubáricas. Por otro lado, el uso de tratamientos para sobrevenir dicho problema también aumenta la tasa de EE por alteración de la función tubárica tras exposición a las hormonas empleadas para la estimulación ovárica. Así, en un estudio multicéntrico se halló que el uso de citrato de clomifeno duplicaba el riesgo, pasando de un 3% a un 6% (Cohen y cols., 1986). También se ha visto que las gonadotropinas incrementan el riesgo ligeramente (Gemzell y cols., 1982; McBain y cols., 1980). Otro factor de riesgo importante para el EE es el antecedente de enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), la incidencia de la cual se incrementa cuanto mayor es el número de parejas sexuales y cuanto más precozmente se inician las relaciones sexuales (Bouyer y cols., 2003). Se ha visto que el antecedente de EPI aumenta el riesgo hasta un 5-10%, ya sea no específicas o por chlamydias o gonococo, sobre todo si estas han sido recurrentes (Hillis y cols., 1997). Otros factores de riesgo son: la endometriosis, las anomalías congénitas de las

trompas, las adherencias secundarias a intervenciones quirúrgicas sobre el útero, el ovario y otros órganos pélvicos o abdominales, las anomalías del cigoto y factores ováricos (Cunningham Gary y cols., 2005; Ault y Faro, 2003). El consumo de tabaco también se ha visto relacionado. En la tabla 1 se resumen los distintos factores de riesgo para el EE y el riesgo específico de cada uno de ellos.

FACTOR DE RIESGO	ODDS RATIO
<b>Alto riesgo</b>	
Cirugía tubárica	21,0
Esterilización	9,3
Embarazo ectópico previo	8,3
Exposición a dietilestilbestrol	5,6
Uso de DIU	4,2-45,0
Patología tubárica documentada	3,8-21,0
<b>Riesgo moderado</b>	
Infertilidad	2,5-21,0
Infecciones genitales previas	2,5-3,7
Múltiples compañeros sexuales	2,1
<b>Riesgo leve</b>	
Cirugía pélvica/abdominal previa	0,9-3,8
Tabaquismo	2,3-2,5
Duchas vaginales	1,1-3-1
Relaciones sexuales tempranas (<18 años)	1,6

Tabla 1: Factores de riesgo del embarazo ectópico. Factores de riesgo del embarazo ectópico con su valor de incremento de riesgo independiente (odds ratio) (tomado de Pisarska y cols., 1998)

### 1.2.5. CLÍNICA Y DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Las manifestaciones clínicas aparecen en torno a las semanas 6-8 de amenorrea, aunque pueden aparecer más tarde, especialmente cuando el EE es de localización no tubárica. La triada clásica es muy inespecífica y consiste en dolor (99%), amenorrea (74%), sangrado vaginal y/o

metrorragia del primer trimestre (56%) (Alsuleiman y Grimes, 1982). Pueden asociar además la sintomatología típica del embarazo normal, como náuseas y dolor mamario. En la exploración, la movilización cervical puede ser dolorosa.

Cuando el EE aumenta de tamaño y causa distensión de la trompa provoca la ruptura de esta, ocasionando sangrado hacia la cavidad peritoneal (hemoperitoneo). El cuadro clínico se caracteriza por dolor intenso en hipogastrio o en la fosa ilíaca correspondiente, que se puede irradiar incluso al epigastrio y al hombro. Se instaura un cuadro de abdomen agudo acompañado de palidez mucocutánea, hipotensión, taquicardia o incluso shock hipovolémico si la hemorragia es severa o persistente (Pisarka y cols., 1998; Farquhar, 2005; Molinaro y Barnhart, 2007). Se han visto una serie de factores relacionados con dicha ruptura como la ausencia de uso previo de anticoncepción hormonal, los antecedentes de daño tubárico e infertilidad, el uso de inductores de la ovulación y elevados niveles de  $\beta$ HCG ( $> 10000$  IU/ml) (Job-Spira y cols., 1999). Un ectópico roto es una emergencia vital y representa una de las complicaciones más temidas del EE. Además el EE es una importante causa de morbilidad a largo plazo ya sea por efecto del tratamiento empleado o por el propio EE, que genera en muchos casos infertilidad secundaria posterior (Horne y cols., 2010).

El diagnóstico diferencial del embarazo ectópico no roto se debe hacer con todas aquellas patologías que causen metrorragia del primer trimestre y/o dolor abdominal agudo. Las causas obstétricas que cursan con sangrado en este trimestre son: hemorragia subcoriónica, amenaza de aborto, aborto diferido, en curso o incompleto (casi la mitad de los casos) y la enfermedad trofoblástica gestacional (Deutchman y cols., 2009). Otras patologías que pueden cursar con clínica similar a un EE se enumeran a continuación: enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), apendicitis, infección urinaria, litiasis o infección renal, cuerpo lúteo persistente, ruptura del cuerpo lúteo, quiste ovárico funcional, endometriosis, volvulus de la trompa u ovario, y diverticulitis (Tulandi, 2013). Por otro lado, la posibilidad de un EE roto debe tomarse en cuenta en el diagnóstico diferencial de un cuadro de shock hipovolémico asociado a dolor abdominal en una mujer en edad fértil.

#### 1.2.6. DIAGNÓSTICO

Los síntomas y signos del embarazo ectópico son altamente inespecíficos; hasta un 9% de los casos transcurren sin síntomas y hasta en el 30% de ellos existe una ausencia total de hallazgos en la exploración física (Tay y cols., 2000). Por ello, el diagnóstico mediante la historia clínica y

la exploración física tiene poca fiabilidad y para su confirmación se requiere el uso de pruebas complementarias como la determinación seriada de  $\beta$ hCG y la ecografía transvaginal (Dart y cols., 1999; Buckley y cols., 1999; Lipscomb, 2004; Menon y cols., 2007; Cartwright y cols., 2009). Sin embargo, en el 8-31% de las pacientes en las que se sospecha EE la ecografía es inconcluyente, es decir, no se observa saco gestacional ni en el interior de la cavidad uterina ni en el exterior de esta (Munro y cols., 2008; Barnhart, 2009). En estos casos, hablamos de gestaciones de localización desconocida. Para conseguir una mayor precisión y precocidad del diagnóstico y por tanto reducir la tasa de complicaciones y errores diagnósticos, se están estudiando diversos marcadores bioquímicos (Barnhart, 2012), como la concentración de progesterona y activinas (Dart y cols., 2002; Kirk y cols., 2009). Sin embargo, algunos estudios documentan que el valor de estos marcadores es limitado (Seeber y Barhart, 2006), ya que sus niveles en sangre periférica pueden ser muy variables (Condous y cols., 2005; Florio y cols., 2007).

#### 1.2.6.1. *EXPLORACIÓN FÍSICA*

En casos de EE precoces puede no hallarse ningún signo en la exploración. En la especuloscopia veremos que el cérvix permanece cerrado y es característico el dolor al provocar su movilización. El útero se encuentra reblandecido, puede o no palpase masa anexial o existir dolor a la presión del fondo de saco vaginal posterior. El hemoperitoneo resultante puede incluso producir abombamiento del saco de Douglas (Vargas, 2010).

La exploración abdominal también suele ser dolorosa, predominando el dolor a la palpación en la fosa iliaca del lado en que este implantado el EE, aunque si hay hemoperitoneo se manifestará con dolor difuso y los signos típicos de peristonismo.

Si el EE se ha roto el estado hemodinámico de la paciente empieza a deteriorarse, con lo que podrán detectarse signos como: palidez mucocutánea, hipotensión postural o basal, taquicardia, incluso pérdida de consciencia transitoria (Farquhar, 2005).

#### 1.2.6.2. *ECOGRAFÍA TRANSVAGINAL*

Es la modalidad de imagen de elección para el diagnóstico del embarazo ectópico, permitiendo detectar la localización con precisión en más del 90% de todos los embarazos y en el 73,9% de los embarazos ectópicos, con un único examen (Kirk y cols., 2007). La ecografía inicial

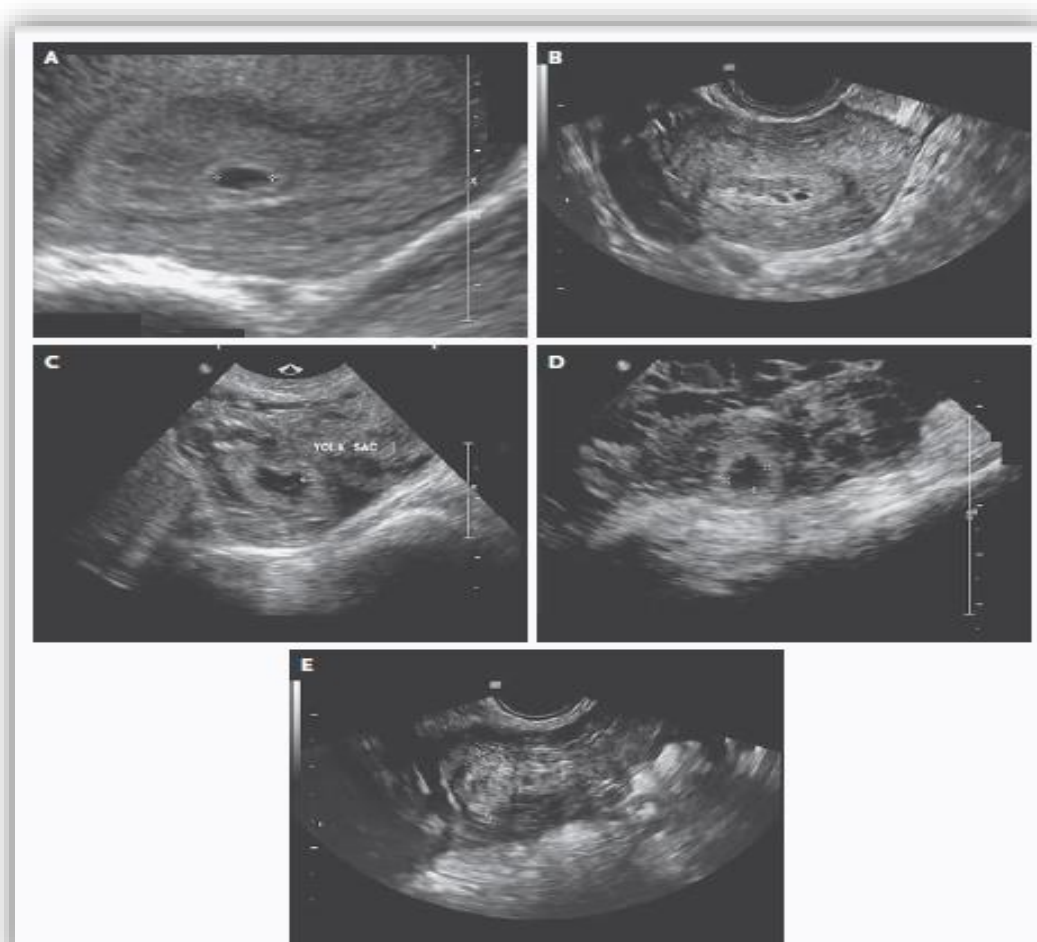
en pacientes con EE no será concluyente en un 15-16% de los casos (Kriebs y Fahey, 2006; Blohm, 2008). En cualquier caso cuando existan dudas, siempre y cuando la paciente esté estable, se debe repetir la ecografía asociada a una nueva determinación de  $\beta$ hCG a las 48 horas.

Cuando la  $\beta$ hCG alcanza niveles de 1.500 a 2.000 mUI/mL, un embarazo normal único debe mostrar un saco gestacional en el ultrasonido transvaginal (Deutchman y cols., 2009). El nivel de zona discriminatoria asciende a 6.500 mUI/mL si se realiza ultrasonido transabdominal convencional, aunque la vía de elección es la vaginal. El saco vitelino se puede identificar a las 3 semanas postconcepción (5 semanas desde la última menstruación) cuando el saco gestacional tiene más de 10 mm de diámetro, y el latido cardiaco embrionario en torno a las 4 semanas postconcepción (6 semanas desde la última menstruación) cuando la longitud cefalocaudal es mayor de 5 mm (Deutchman y cols., 2009). Con excepción del embarazo heterotópico, entidad muy poco frecuente, la identificación por ultrasonido de un embarazo intrauterino descarta la posibilidad de embarazo ectópico.

La ecografía transvaginal en el diagnóstico del embarazo ectópico tiene una sensibilidad del 73,9% (IC95%: 65,1-81,6), una especificidad del 99,9% (IC 95%: 99,8-100), un valor predictivo positivo del 96,7% (IC 95%: 90,7-99,3) y un valor predictivo negativo del 99,4% (IC 95%: 99,2-99,6) (Kirk y cols., 2007). La detección por ultrasonido transvaginal de una masa anexial, combinada con una concentración de  $\beta$ hCG de 1.000 mUI/mL, tiene una sensibilidad del 97%, una especificidad del 99% y unos valores predictivos positivo y negativo del 98% para diagnosticar embarazo ectópico.

Los hallazgos ultrasonográficos más específicos en el diagnóstico ecográfico del EE pueden ser desde un saco gestacional claro, con o sin embrión con o sin latido cardiaco (14%), a una masa extraovárica heterogénea (64%) o incluso un simple anillo tubárico hiperecogénico (22%) sugestivo de EE precoz. Estos signos son indicativos de EE tubáricos. Como hemos dicho anteriormente, la trompa es el lugar de asiento más frecuente del EE por lo que se debe fijar especial atención en la zona comprendida entre el útero y el ovario. En el 20% de los casos se observan imágenes de pseudosaco en el interior de la cavidad. Esta imagen es el resultado de una colección de líquido rodeada de una reacción decidual y se diferencia de un saco verdadero porque no tiene anillo ecogénico alrededor, se suele localizar en el centro de la cavidad y puede estar tabicado o cambiar de forma a lo largo de la exploración (Tulandi y Al-Jaroudi, 2004). En los anexos se deben diferenciar los EE localizados en la zona proximal de la trompa o en el ovario, del cuerpo lúteo. La diferencia es clara cuando este tiene paredes finas y por su localización claramente intraovárica, en tanto que cuando son de tipo hemorrágico esta diferenciación es más dificultosa, ya que presenta paredes más gruesas o incluso puede dar aspecto de masa exofítica (Barnhart y cols., 2003). La ecogenicidad nos puede ayudar a diferenciarlos, puesto que la del

cuerpo lúteo es similar e incluso menor que la del ovario y la masa de un EE suele tener mayor ecogenicidad que el parénquima (Buster y Krotz,2007). También se puede recurrir a una ecografía bimanual ejerciendo presión suprapúbica para intentar movilizar el anexo y ver así si la localización de la imagen sospechosa es intra o extraovárica. Esta maniobra debe hacerse con especial cautela para evitar la ruptura del EE (Seror y cols, 2001). En ocasiones se aprecia líquido libre peritoneal correspondiente al hemoperitoneo por rotura del EE, que a su vez puede formar colecciones compatibles con hematomas organizados en cavidad libre. En la figura 4 se representan algunas diferencias ecográficas entre los embarazos intrauterinos y diferentes formas de presentación de embarazos extrauterinos.

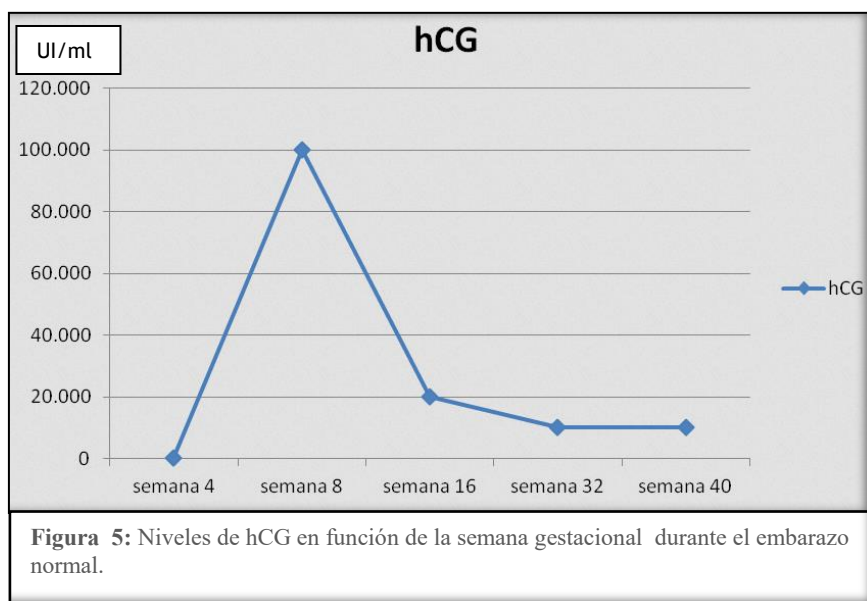


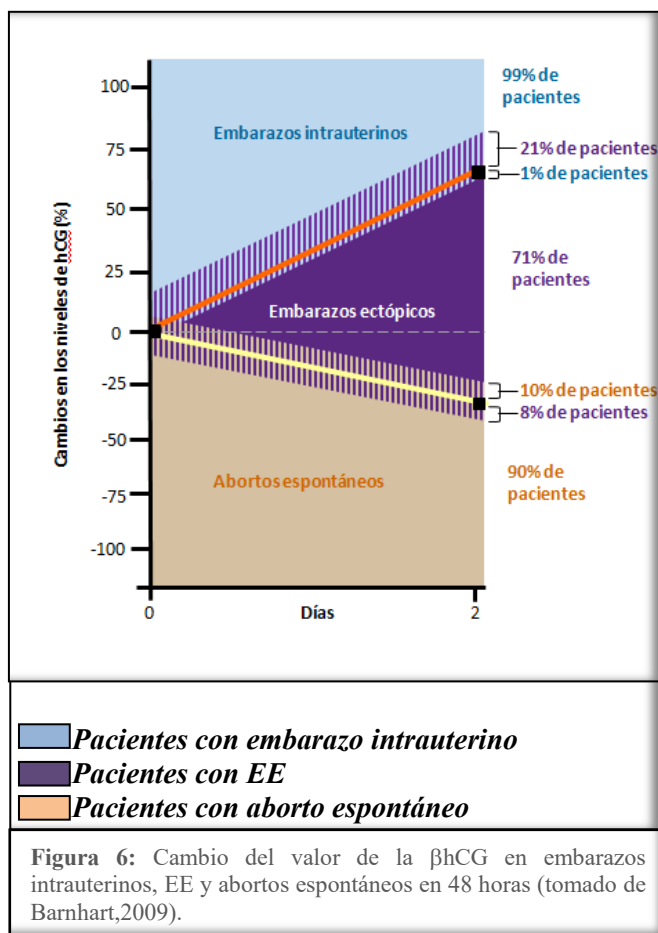
**Figura 4. Diferentes imágenes ecográficas de embarazos intrauterinos y embarazos extrauterinos.** A: saco intrauterino de gestación precoz normal; B: Pseudosaco intrauterino.; C:saco gestacional y saco vitelino con líquido libre asociado; D: signo del anillo alrededor de un saco extrauterino; E: EE en forma de masa tubárica sin evidencia de saco gestacional.



### 1.2.6.3. DETERMINACIÓN SERIADA DE BHCG

La unidad  $\beta$  de la hCG ( $\beta$ hCG) sérica constituye el único marcador que se emplea en la actualidad de forma rutinaria en el diagnóstico del EE. La  $\beta$ hCG comienza a detectarse en sangre a los 8 días de la concepción una vez ha ocurrido el pico de LH (Kirchler y cols., 1993; Daya, 1987). Sus niveles son proporcionales a la masa placentaria y crecen exponencialmente en etapas tempranas de la gestación, con curvas de ascenso bien establecidas. Aunque el patrón es de similar comportamiento, existe una gran variabilidad interindividuo en los niveles hormonales absolutos según la edad gestacional (Cole, 2011). En los casos de embarazo intrauterino normal la concentración de la hormona se duplica aproximadamente cada 1,4 - 2,1 días, con un aumento mínimo de 50% en dos días hasta la semana 10 de gestación, a partir de la cual el ascenso es más gradual, convirtiéndose en una meseta hacia el inicio del segundo trimestre (figura 5). En los embarazos intrauterinos de mal pronóstico y en los ectópicos no se observa la progresión normal de la  $\beta$ hCG. A partir de estos hallazgos, se han diseñado unas curvas para identificar un patrón de normalidad/anormalidad que permite establecer un diagnóstico temprano de EE) (figura 6), de modo que ante una elevación anómala se debe realizar una búsqueda del EE exhaustiva mediante ecografía (Horne y cols., 2011).





Cuando el nivel está por debajo de 1500 mUI/ml y en la ecografía transvaginal no se consigue identificar el saco gestacional (intra o extraútero), se considera una gestación de localización desconocida (GLD). Esto puede deberse a que sea una gestación de menor tiempo o una gestación intrauterina no viable o en el 8-40% tratarse al final de un EE (Condous y cols., 2005). Se ha descrito que con niveles de βhCG superiores a 1.500 mUI/mL es posible visualizar el embarazo intrauterino por ecografía en el 91,5% de los casos. Por tanto, con estos niveles de hormona y sobre todo si este supera las 2000 mUI/ml, la ausencia de saco gestacional intraútero debe hacernos sospechar fuertemente un embarazo ectópico (Barnhart y cols., 1999). También debe considerarse la posibilidad de un embarazo ectópico cuando después de realizarse un legrado uterino no ocurre un descenso  $\geq 15\%$  de la βHCG en 8-12 horas. Existen situaciones como las gestaciones múltiples, en las cuales se han informado concentraciones de βhCG  $>2300$  mUI/mL antes de la identificación de los sacos gestacionales por ultrasonido transvaginal. Esto hace que resulte de mayor interés la valoración de la βhCG en el tiempo (determinaciones seriadas 48-72 horas) y no en una determinación puntual (VanMello y cols., 2012).

#### 1.2.6.4. *PROGESTERONA SÉRICA*

La determinación de progesterona sérica aporta información acerca de la viabilidad de la gestación pero no así de su localización. Niveles  $\leq 20$  nmol/L orientan claramente hacia una GLD o un EE, mientras que niveles  $\geq 25$  y sobre todo  $\geq 60$  se asocian a gestaciones viables (RCOG, 2006). Por todo ello la indicación de la determinación de la progesterona vendrá dada por aquellos casos de GLD o EE con niveles de  $\beta$ hCG en descenso pero persistentes, en los que niveles de progesterona  $\leq 20$  nmol/L permitirá retrasar los controles periódicos, ya que el cociente de probabilidad de que evolucione hacia resolución completa es de 45 (Verhaegen y cols., 2012).

#### 1.2.6.5. *CURETAJE UTERINO*

En la actualidad se practica excepcionalmente. La muestra endometrial puede obtenerse por biopsia en la consulta o con dilatación y legrado en el quirófano. Se debe hacer solamente cuando se diagnostica un embarazo no viable (por ausencia de progresión de la  $\beta$ hCG o por concentración de progesterona menor de 5 ng/mL). Si no se observa saco dentro del útero con la ecografía transvaginal y la  $\beta$ hCG está aumentada por encima de la zona discriminatoria, usualmente es innecesario el curetaje uterino para confirmar el embarazo ectópico. Lo que se busca con el curetaje es determinar si hay o no vellosidades coriales, las cuales se pueden observar macroscópicamente con la prueba de flotación en solución salina o por examen microscópico. Si se encuentran vellosidades coriales en el material del legrado el diagnóstico más probable es el de aborto, aunque existe la posibilidad de un embarazo heterotópico. Por el contrario, la ausencia de vellosidades coriales apoya el diagnóstico de embarazo ectópico; una excepción sería el aborto completo. Además de descartar la presencia de vellosidades coriales, en el embarazo ectópico pueden encontrarse un endometrio hipersecretor y el signo de Arias- Stella (Gracia y Barnhart, 2001).

#### 1.2.6.6. *LAPAROSCOPIA*

En casos de incertidumbre diagnóstica, con prueba de embarazo negativa podría realizarse una laparoscopia exploradora si la semiología fuera indicativa o con test de gestación positivo y una ecografía no concluyente, ya que permitiría el diagnóstico y tratamiento simultáneo con una mínima invasión quirúrgica. La existencia de un cuerpo lúteo hemorrágico o un embarazo ectópico con estabilidad hemodinámica también podrían beneficiarse de este tipo de abordaje (Ovejero y cols., 2011).

### 1.2.6.7. NUEVOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE GESTACIÓN ECTÓPICA O GESTACIÓN DE LOCALIZACIÓN DESCONOCIDA

El desarrollo de nuevos marcadores se basa en la alteración de la fisiología que tiene lugar en el EE y que se refleja en un funcionamiento deficiente del trofoblasto, del cuerpo lúteo así como un daño muscular de la pared de la trompa y una alteración del proceso de la angiogénesis asociada a la gestación normal. Por todo ello, se han clasificado los marcadores en: marcadores embrionarios o placentarios, marcadores de función del cuerpo lúteo, marcadores endometriales y de la angiogénesis, marcadores de daño tubárico y marcadores inflamatorios o de irritación peritoneal (tabla 2).

<b>Marcadores embrionarios o placentarios (placentación anómala)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math>hCG sérica</li> <li>• Activina A+</li> <li>• SP1 (<math>\beta</math>-glicoprotrína específica de la gestación)</li> <li>• Disintegrina y metaloproteasa 12 (ADAM 12)</li> </ul>
<b>Marcadores de función del cuerpo lúteo</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progesterona</li> <li>• Inhibina A</li> <li>• Estradiol</li> <li>• Relaxina</li> <li>• Renina</li> </ul>
<b>Marcadores de angiogénesis</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• VEPG (vascular endotelial growth factor)</li> <li>• Angiopoyetina 1 y 2 ( ANG 1 y ANG 2)</li> </ul>
<b>Marcadores de daño tubárico y daño muscular</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Creatinina Kinasa</li> <li>• Mioglobina</li> <li>• Miosina de músculo liso-cadena pesada</li> </ul>
<b>Marcadores inflamatorios o de irritación peritoneal</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukina 8</li> <li>• Interleukina 6</li> <li>• Factor de necosis tumoral <math>\alpha</math></li> <li>• Ca 12.5</li> </ul>
<b>TABLA 2:</b> Marcadores bioquímicos de EE y gestación de localización desconocida.

#### 1.2.6.7.1. *Marcadores embrionarios o placentarios*

La proteína A plasmática asociada a la gestación (PAAP- A) es una proteína sintetizada por el trofoblasto que se emplea en la actualidad en el cribado bioquímico del primer trimestre junto con la  $\beta$ hCG. Niveles bajos se han relacionado con aneuploidía y aborto precoz así como con otras complicaciones obstétricas como el bajo peso para la edad gestacional o la preeclampsia (D'Antonio y cols., 2013). Sin embargo, su papel en la gestación temprana viene dado más por la identificación de viabilidad que por la localización de la misma, por lo que no ayuda a discriminar la localización eutópica o ectópica de la gestación.

La activina A es una glicoproteína dimérica de la superfamilia TGF-  $\beta$ , un grupo de diversos factores de crecimiento implicados en la proliferación y diferenciación celular. (Horne y cols., 2011). Durante el embarazo, la placenta es el principal productor de la activina A, de forma que sus niveles en la circulación materna van aumentando conforme progresa la gestación, alcanzando su nivel máximo al término (Condous y cols., 2006; Morse y cols., 2012). Esta proteína se ha visto implicada en la fisiología endocrina del embarazo. Datos in vitro sugieren que tiene un papel en la decidualización endometrial, por lo que una alteración en su producción podría derivar en un endometrio escasamente vascularizado y por tanto con una estructura anormal, lo que podría favorecer la implantación fuera del útero (Florio y cols., 2007). Sus niveles varían ante alteraciones de invasión trofoblástica e implantación. Se han visto niveles reducidos en gestaciones no viables, comprobándose los niveles mínimos en EE (Dart y cols., 2002; Florio y cols., 2007; Kirk y cols., 2009). Por otro lado, sus niveles se elevan en casos de preeclampsia (Reis y cols., 2002), retraso de crecimiento intrauterino y sobre todo en la mola hidatiforme (Florio y cols., 2002).

Debido a los niveles tan bajos detectados en el EE, el grupo de Florio y cols. contempla que la determinación aislada de la activina A, estableciendo el punto de corte por debajo de 0,37 ng/ ml, consigue un test con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 99,6%. No obstante, su aplicación en clínica debe aún ser estudiada y discutida con mayor profundidad.

#### 1.2.6.7.2. *Marcadores de función del cuerpo lúteo*

De los marcadores de función del cuerpo lúteo ya nos hemos referido anteriormente a la progesterona por ser ya de uso habitual en la práctica clínica.

La inhibina A se ha encontrado disminuida en casos de EE si se compara con los niveles

hallados en gestaciones evolutivas. Actualmente se considera un buen marcador de viabilidad, pero dados los resultados contradictorios obtenidos en cuanto a la predicción de localización de la gestación, probablemente se necesiten estudios adicionales antes de considerar a este marcador como candidato para EE (Kirk y cols., 2009; Puente, 2014).

#### 1.2.6.7.3. *Marcadores endometriales y de la angiogénesis*

Tanto durante el ciclo menstrual como posteriormente durante la implantación y las fases posteriores, tiene lugar un intenso proceso de remodelación vascular; proceso que permite tanto la implantación como el normal desarrollo placentario. Se han descrito patrones alterados de la expresión de los marcadores angiogénicos en el aborto, el retraso de crecimiento intrauterino, la preeclampsia e incluso en el EE, aunque para el EE existen aún pocos estudios.

Las células del sincitotrofoblasto y del trofoblasto sintetizan angiopoyetina 1 y 2 (ANG 1 y 2) y las células endoteliales solo ANG 2. Se ha descrito una disminución de los niveles de ANG 1 y 2 en el aborto temprano y en el EE. También se encuentra menor expresión de ARNm de ANG 1 en el trofoblasto de estas gestaciones. La ANG 1 es capaz de discriminar también entre EE y aborto, no así la ANG2 (Daponte y cols., 2013).

#### 1.2.6.7.4. *Marcadores de daño tubárico*

Estos marcadores se basan en la liberación de sustancias por parte del músculo liso tubárico una vez que se ha sometido a la invasión trofoblástica. Se han estudiado la mioglobina y la miosina del músculo liso, sin embargo no se han podido obtener resultados satisfactorios (Puente, 2014)

#### 1.2.6.7.5. *Marcadores inflamatorios o de irritación peritoneal*

Las citoquinas son polipéptidos que se han vinculado a numerosas funciones reproductivas, sobre todo a la implantación embrionaria. Así, se han estudiado la IL 8, IL 6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), como reflejo de inflamación e irritación peritoneal (Soriano y cols., 2003), encontrando que los tres marcadores estarían aumentados en los casos de gestación ectópica frente a aborto o gestación evolutiva. En concreto, niveles de IL 8 por encima de 40

pg/mL fueron capaces de diferenciar gestación intrauterina de gestación extrauterina con una sensibilidad del 82,4% y una especificidad del 81,8%. Si se asociaban los tres marcadores la sensibilidad ascendía al 100%, mientras que la especificidad bajaba al 52,9%.

Dado que el rendimiento diagnóstico de un único marcador puede no resultar útil, se han descrito varios estudios en relación con la aplicación de varias combinaciones de éstos con el fin de mejorar su capacidad diagnóstica. Este es el caso de la asociación de VEGF, PAAP-A y la progesterona con la que se encontró una sensibilidad del 97,7% y una especificidad del 92,4% o, la asociación de VEGF con progesterona, inhibina A y activina A con las que se alcanza una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% (Mueller y cols., 2004).

### 1.2.7. TRATAMIENTO DEL EMBARAZO ECTÓPICO

Existen varias alternativas para el tratamiento del EE. En situaciones seleccionadas, en las que se cumplan los criterios que serán enumerados en el próximo apartado, es posible evitar el tratamiento quirúrgico y tratarlo con un fármaco quimioterápico (metrotexate). El resto de los casos que no cumplan dichos criterios y en todas las ocasiones en que el EE se presenta como una emergencia por su ruptura, el tratamiento debe ser quirúrgico.

#### 1.2.7.1. *TRATAMIENTO MÉDICO*

Los casos de EE diagnosticados precozmente pueden resolverse mediante la administración de un tratamiento médico. Esta pauta permite abaratar los costes, evitar la morbilidad que genera una cirugía, así como conservar la permeabilidad tubárica y por ende la fertilidad. Este tratamiento se basa en la administración de un antagonista del ácido fólico, el metrotexate, el cual interfiere con la síntesis de ADN y la multiplicación celular. Se considera una alternativa segura al tratamiento quirúrgico en casos seleccionados (Stovall y cols., 1989; Barnhart y cols., 2007). Para que un EE sea candidato a este tratamiento se deben cumplir los siguientes criterios: 1) estabilidad hemodinámica, 2)  $\beta\text{hCG} \leq 5.000 \text{ mUI/mL}$ , 3) masa anexial  $\leq 3,5 \text{ cm}$ , y 4) ausencia de latido cardiaco (Elito y cols., 2009; Domínguez y cols., 2014). Se requiere hospitalización inicial de la paciente para la administración del tratamiento, evaluación clínica

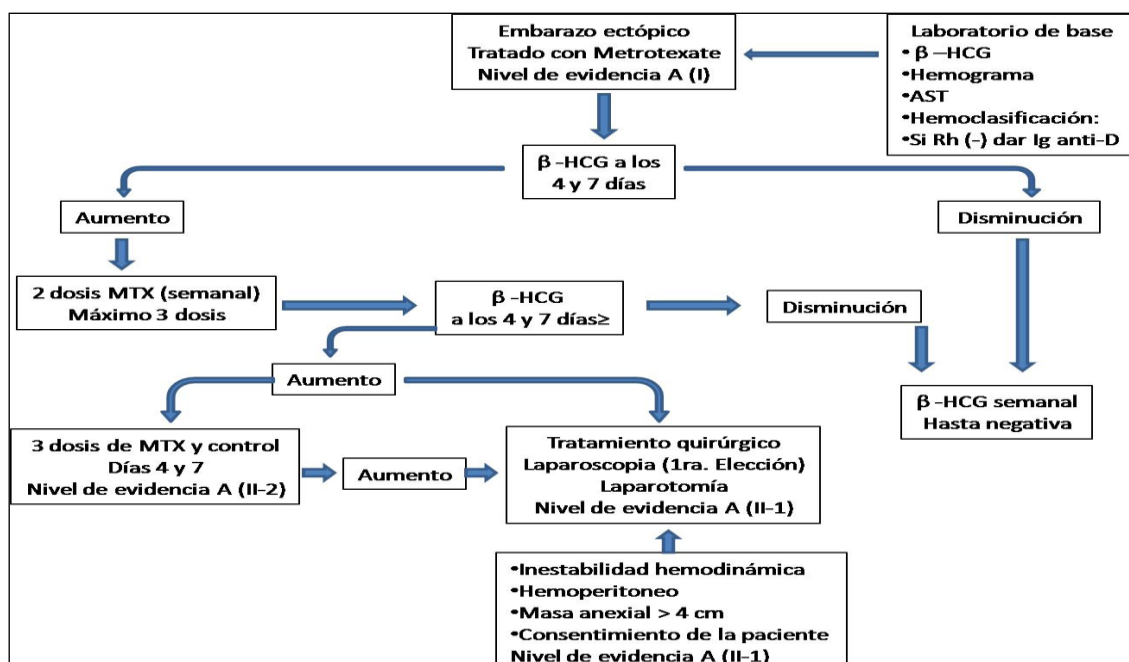
estricta y posterior seguimiento con determinación semanal de la  $\beta$ hGC hasta que su valor se encuentre por debajo de 5 mUI/ml.

Las contraindicaciones para el tratamiento con metotrexate son: disfunción hepática, niveles de transaminasa glutámico-oxaloacética (GOT) del doble de lo normal, enfermedad renal, creatinina >1,5 mg/dl, úlcera péptica activa, discrasia sanguínea, leucocitos <3.000/mm<sup>3</sup>, plaquetas <100.000/  $\mu$ l, sospecha de pobre cumplimiento por parte de la paciente y la presencia de actividad cardíaca fetal. Los fracasos del tratamiento con metotrexate son más comunes cuando los niveles de  $\beta$ hCG son más altos o la masa anexial es grande (Vargas, 2010).

### 1.2.7.1.1. Pauta de tratamiento médico

El metotrexate se puede administrar en dosis única (lo más empleado), dosis múltiples variables, o en inyección local.

El esquema de dosis única consiste en administrar 50 mg de metotrexate por superficie corporal (50 mg/m<sup>2</sup>), por vía intramuscular. Su manejo se resume en la figura 7. Con este esquema se obtiene un 87% de éxito y la incidencia de EE posterior es solo del 13% (Barnhart, 2003). El 8% de las pacientes sin embargo, requieren repetir la dosis de metotrexate. No se recomiendan más de 3 ciclos de tratamiento con esta pauta (Elito y cols., 2009).



**Figura 7: Diagrama de flujo para el tratamiento médico en pauta de dosis única del embarazo ectópico.** Tras la administración de 50mg/m<sup>2</sup> se realiza un control de la respuesta al tratamiento mediante la determinación de la  $\beta$ hCG, el día de la administración del metotrexate y el cuarto y el séptimo día después de su administración. Si la reducción de los títulos de  $\beta$ hCG entre el cuarto y el séptimo día está por encima del 15% presentan buen pronóstico y requieren seguimiento semanal de la hormona hasta que esté en niveles pregestacionales. Si el séptimo día la  $\beta$ hCG es mayor, igual, o su declinación es menor de 15% del valor del cuarto día se debe repetir la dosis (2<sup>a</sup> dosis) y volver a reiniciar el esquema de control. Se administrarán un máximo 3 ciclos de tratamiento (3<sup>a</sup> dosis).



### 1.2.7.2.1. *Indicaciones del tratamiento quirúrgico*

Se consideran indicaciones absolutas para el tratamiento quirúrgico: la presencia de hemoperitoneo con inestabilidad hemodinámica, si existe sospecha de rotura inminente, una puntuación preterapéutica de Fernández superior a 13 (tabla 3) (Fernández y cols., 1991), cuando se trata de una recurrencia de embarazo extrauterino sobre una trompa operada previamente donde se prevea una salpingectomía obligada o en casos de incertidumbre diagnóstica, para realizar el diagnóstico definitivo y tratamiento del mismo si se confirmase el EE. También es una opción adecuada cuando la paciente, una vez expuestas las ventajas y desventajas de las dos alternativas terapéuticas, prefiere la opción quirúrgica, o en situaciones que se constate dificultad para el seguimiento de dicha paciente.

	1	2	3
Amenorrea (días)	> 49	≤ 49	≤ 42
GCH (mUI/ml)	≤ 1.000	≤ 5.000	> 5.000
Progesterona (ng/ml)	≤ 5	≤ 10	> 10
Dolor	Sin dolor	Provocado	Espontáneo
Hematosalpinx (cm)	≤ 1	≤ 3	> 3
Hemoperitoneo (ml)	≤ 10	≤ 100	> 100

GCH: gonadotropina coriónica humana.

Tabla 3: Puntuación preterapéutica de Fernández (tomado de Ovejero y cols.)

### 1.2.7.2.2. *Vías de abordaje*

Hoy en día, la vía laparoscópica es la preferida y la más coste-efectiva (Hajenius y cols., 2007). La laparotomía debe reservarse para casos con hemoperitoneo importante, sangrado activo abundante o imposibilidad de visualizar correctamente la pelvis mediante la laparoscopia. El tipo de abordaje vendrá dado, por tanto, por la situación clínica de la paciente, la urgencia de actuación necesaria y la experiencia del cirujano.

### 1.2.7.2.3. *Técnicas quirúrgicas*

El tratamiento quirúrgico puede basarse en la extirpación de toda la trompa (salpingectomía) o bien en la sección de la trompa y exéresis del saco gestacional (salpingostomía).

Estudios observacionales indican que las mujeres tratadas con salpingostomía frente a las tratadas con salpinguectomía tienen tasas de gestación posterior superiores (73% vs 57%) pero las tasas de EE también aumentan significativamente (15% vs 10%) (Seeber y cols., 2006; Hajenius y cols., 2007; Mol y cols., 2008). La decisión de realizar una técnica u otra en muchas ocasiones se toma de forma intraoperatoria.

La salpinguectomía es la técnica más empleada, la cual tiene especial indicación cuando la trompa presenta un gran daño, se trata de una recurrencia en la misma trompa, su tamaño supera los 5 cm o bien existe un sangrado incontrolado después de intentar una salpingostomía. El manejo más conservador con salpingostomía quedaría reservado para pacientes jóvenes con deseo genésico, ya que esta requiere controles posteriores de  $\beta$ hCG hasta su negativización porque pueden quedar restos de tejido trofoblástico hasta en el 5-20% de los casos. Así mismo, también exige posterior comprobación de la permeabilidad tubárica. Cuando se detecta un EE persistente tras la realización de una salpingostomía se puede valorar tratamiento con metrotexate o realizar una salpinguectomía (Seifer y cols., 1993).

## 1.3. MICRORNAs

### 1.3.1. ¿QUÉ ES UN MICRORNA?

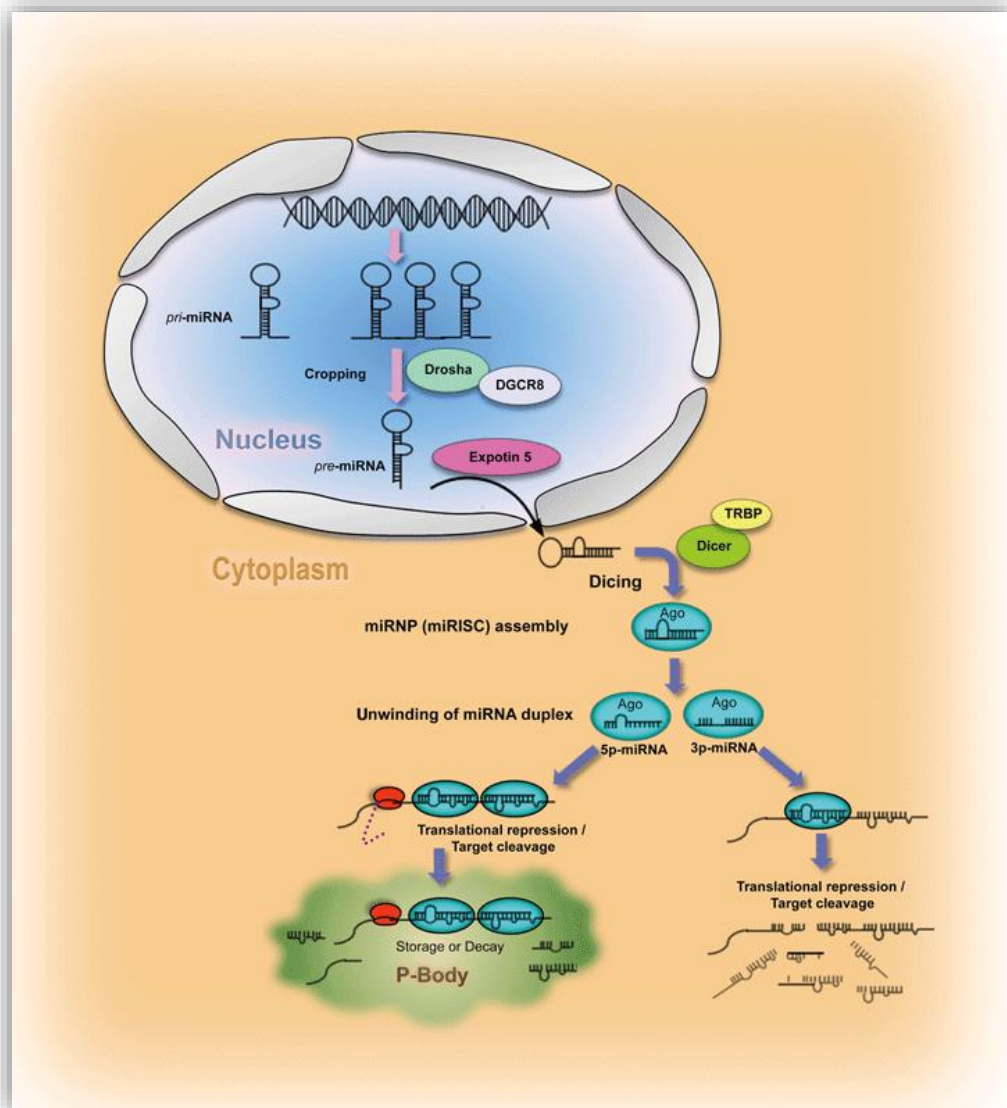
En las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto que la regulación de una gran variedad de procesos biológicos no depende únicamente de mecanismos de control transcripcional (regulación genética), sino que engloba igualmente mecanismos epigenéticos. Éstos incluyen mecanismos clásicos de control epigenético, tales como la metilación del DNA o las modificaciones postranscripcionales de histonas, pero también elementos no convencionales de regulación de la expresión génica, como ciertos RNAs pequeños no codificantes (small non-coding RNAs o ncRNA), de entre los que destacan los microRNAs (miRNAs). En este sentido, se ha estimado que más del 95% del transcriptoma humano está compuesto por ncRNA, (Zhang y cols., 2007; Lee y Dutta, 2009). De hecho, el número de miRNAs identificados en diversas especies se ha incrementado de forma exponencial en los últimos años desde que en 1993 Lee y cols descubrieran estas moléculas en la especie *Caenorhabditis Elegans*.

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante, de entre 18-25 nucleótidos (nt) de longitud, que operan como reguladores postranscripcionales de la expresión de numerosos genes diana (Bartel, 2004). Los miRNA 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 miRNA maduros por acción secuencial del complejo enzimático Dicer y miRISC (Prieto y Markert., 2011). Por último, los miRNAs maduros se asocian con el complejo RISC, reprimiendo la traducción de proteínas (figura 8) (Cheng *et al* 2005, Bueno *et al* 2008, Qavi *et al* 2010).

En animales, el principal mecanismo de regulación por miRNAs viene dado por su capacidad de unión por homología parcial a secuencias complementarias en las regiones 3'-UTR de diferentes RNA diana, provocando en la mayoría de los casos silenciamiento génico por bloqueo de la traslación (Yu, 2008). Eventualmente, ciertos miRNAs pueden favorecer la degradación de sus RNA diana, promoviendo del mismo modo la supresión de la expresión. En todo caso, se han descrito también sitios de reconocimiento de miRNAs en regiones codificantes y 5'-UTR de ciertos genes, y en ciertas ocasiones la acción de miRNAs se ha asociado a un aumento de la expresión de genes diana.

Un aspecto importante es que los miRNAs, además de encontrarse a nivel citoplasmático

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 miRNAs 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).



**Figura 8: Proceso de síntesis de miRNA maduro.** El precursor de RNA (pri-miRNA) es transformado por acción del complejo nuclear Droscha en pre-miRNA dentro del núcleo. Tras su exportación al citoplasma se convierte en un miRNA maduro por acción del complejo enzimático Dicer. Finalmente el miRNA maduro se asocia a miRISC reprimiendo la traducción de proteínas. (tomado de Singh y cols.,2008).

Destacablemente, un mismo miRNA puede presentar secuencias de reconocimiento en las 3'-UTRs de numerosos genes, lo que incrementa considerablemente su capacidad reguladora. Estimaciones informáticas indican que un mismo miRNA puede regular hasta 100 targets génicos, pudiendo afectar de forma colectiva a diversos elementos de una misma ruta o proceso biológico (Yu, 2008; Bueno y cols., 2008). Alternativamente, un mismo gen diana puede estar sometido a la acción reguladora de numerosos miRNAs. Por otro lado, la expresión de los distintos miRNAs es sensible a la acción moduladora de numerosos factores, incluyendo tanto señales endógenas como ambientales (Prieto y Markert, 2011). Esta multiplicidad de miRNAs, targets potenciales y sistemas de control resultan en una combinación exponencial de posibilidades de regulación, que otorga al sistema de una considerable plasticidad, óptima en el control de procesos biológicos complejos. En este sentido, diversos estudios de expresión y funcionales han documentado la presumible implicación de familias de miRNAs en la regulación de procesos biológicos diversos que incluyen la proliferación y el metabolismo celular, la apoptosis, el desarrollo neuronal, la hematopoyesis, la transformación tumoral, mecanismos de control epigenético, tales como la propia metilación del DNA y la modificación de histonas, y más recientemente la homeostasis glucídica, la sensibilidad a la insulina y diversas rutas metabólicas (Zhang y cols., 2007; Rivera y Bennett, 2010; Jordan, 2011; Zhu, 2011). También existen ya numerosas investigaciones acerca de la implicación de los miRNAs en diversas patologías obstétricas y ginecológicas, como la preeclampsia, el retraso de crecimiento intrauterino (Mayor-Lynn y cols., 2011; Chen y Wang, 2013; Xu y cols., 2014; Sandrim y cols., 2016), el cáncer de cérvix, endometrio y ovario o la endometriosis (Gilabert y cols., 2012). A pesar de este número creciente de evidencias experimentales, numerosos aspectos acerca del papel fisiológico y fisiopatológico de los sistemas de regulación por miRNAs permanecen aún desconocidos.

### 1.3.2. PAPEL DE LOS MICRORNAs EN LA IMPLANTACIÓN

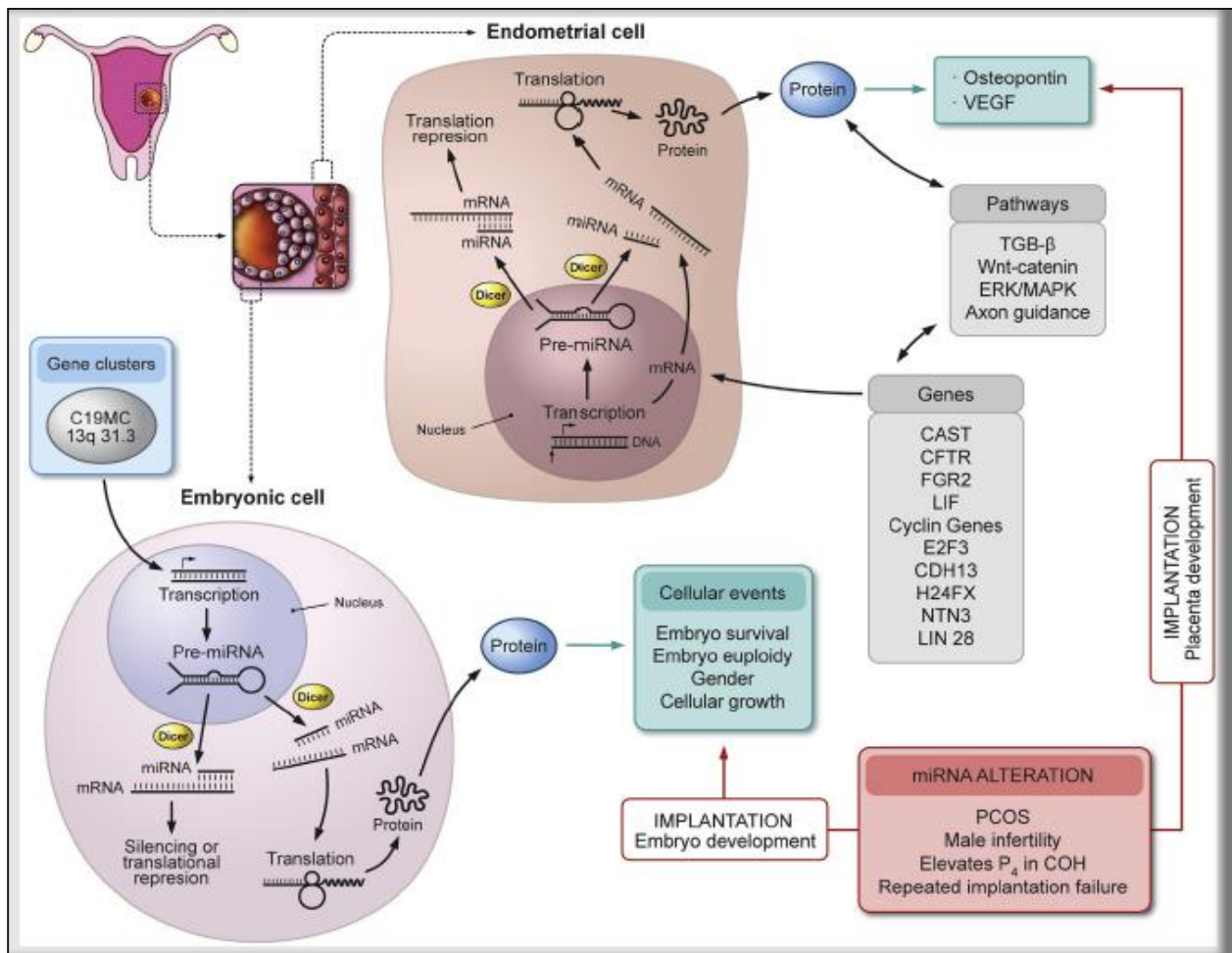
En la actualidad, el conocimiento que tenemos acerca de los posibles mecanismos implicados en la implantación, tanto en condiciones normales como en el fracaso de la misma o la implantación anómala, es todavía muy limitado. No obstante, en la última década el desarrollo de la biología molecular ha permitido la investigación sobre la genómica del desarrollo endometrial humano (Martín y cols., 2002; Domínguez y cols., 2003; Horcajadas y cols., 2004).

Entender cuál es la implicación de los miRNAs 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, incrementando con ello el éxito de la reproducción.

Hu y cols. demostraron un aumento de miR-21 en los sitios de implantación sobre el día 5 de embarazo, sugiriendo esto que este miRNA tiene una función importante durante la implantación embrionaria. Kuokkanen y cols. encontraron 12 miRNAs (miR29B, miR29C, miR30B, miR30D, miR31, miR193A-3P, miR203, miR204, miR200C, miR210, miR582-5P, and miR345) que estaban elevados en el endometrio durante la fase secretora del ciclo menstrual, actuando como supresores de genes del ciclo celular lo cual confirma que inhiben la proliferación celular. Posteriormente, Altmäe y cols. analizaron biopsias endometriales en la fase preceptiva del ciclo (LH+2) y en la fase receptiva (LH+7) de mujeres fértiles y encontraron que un grupo de miRNAs (hsamiR-30b y hsa-miR-30d) estaban significativamente sobreexpresados, mientras que los niveles de hsa-miR-494 y hsa-miR-923 estaban disminuidos. Además, Galliano *et al.* hicieron una revisión sistemática de los miRNAs relacionados con la implantación humana y concluyeron que los miRNAs tienen un papel fundamental y están implicados en procesos de viabilidad embrionaria, 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.

La figura 9 muestra los posibles mecanismos de estricta regulación por los que los miRNAs potencialmente estarían implicados en el proceso de implantación, actuando tanto a nivel embrionario como a nivel endometrial.



**Figura 9: Mecanismos de regulación de los miRNAs en el proceso de implantación.** Los miRNAs están implicados tanto a nivel endometrial como a nivel embrionario. Determinados miRNAs 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 miRNAs anómalos (tomado de Galliano y cols., 2014).

### 1.3.3. PAPEL DE LOS MICRORNAs EN LA PLACENTA

La identificación de los miRNA, como moléculas con capacidad reguladora de múltiples dianas y procesos biológicos, que incluyen la proliferación celular, la apoptosis y la remodelación tisular, condujo a la realización de estudios de expresión de familias de estos ncRNAs en diversos tejidos, incluida la placenta (Barad 2004; Liang y cols., 2007). Estos análisis sentaron las bases de estudios posteriores dirigidos a identificar familias de miRNAs con posible implicación en aspectos básicos de la fisiología placentaria. Si bien el número de análisis a este respecto es aún limitado, los estudios publicados hasta la fecha han permitido identificar miRNAs

específicamente expresados en placenta e iniciar la caracterización de cambios en los niveles de miRNAs concretos durante la gestación normal y patológica.

Los estudios iniciales de perfiles de expresión de miRNAs en diversos tejidos humanos por microarrays identificaron grupos miRNAs selectivamente expresados en tejido placentario; entre otros, miRNAs de los tipos 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 (Barad 2004; Liang y cols., 2007; Donker y cols., 2012).

Curiosamente, muchos de los miRNAs que se expresan específicamente en la placenta están codificados por el cluster C14MC y el cluster C19MC (localizado en la región del cromosoma 19q13), que es uno de los clusters humanos de genes de miRNAs más grandes descubiertos hasta la fecha (Noguer-Dance y cols., 2010; Chen y Wang, 2013), siendo el cluster C19MC de herencia paterna y el C14MC de herencia materna. Ambos clusters parecen jugar un papel importante en la regulación de la diferenciación celular y la inmunomodulación durante el embarazo (Gu y cols, 2013)

Gu y cols. publicaron en 2013 un estudio donde comparaban las diferencias de expresión de diversos miRNAs en el primer (6-8 semanas) y tercer trimestre de gestación. Obtuvieron 191 miRNAs que estaban distintamente expresados en el primer y el tercer trimestre. Los miRNAs de los clusters miR-17-92, C14MC, miR-371, y C19MC estaban significativamente sobreexpresados en el primer trimestre, en tanto que los miRNAs de las familias Let-7 y miR-34, y de los clusters miR-29, miR-195 y miR-181c, estaban sobreexpresados en las placentas del tercer trimestre. Concluyeron que los miRNAs con función oncogénica, angiogénica o antiapoptótica estaban predominantemente expresados en el primer trimestre, mientras que los miRNAs que promueven la diferenciación celular y que actúan de supresores tumorales están más expresados en el tercer trimestre, lo cual hace pensar que estos miRNAs tienen un papel crítico en el desarrollo placentario.

#### 1.3.4. MICRORNAS CIRCULANTES DURANTE LA GESTACIÓN

Un aspecto muy notable en relación con los miRNAs en general, y los de expresión placentaria en particular, es que éstos pasan al torrente circulatorio donde son detectables mediante técnicas convencionales, tales como stem-loop RT-PCR y arrays. Es destacable el hecho



de que los miRNAs son enormemente estables, lo que facilita metodológicamente su detección en muestras congeladas de plasma/suero (Reid y cols., 2011). De hecho, desde 2008 hasta la fecha, han sido publicados un número aún limitado, aunque ilustrativo, de estudios que documentan cambios en los perfiles circulantes de miRNAs tanto en gestación normal como en ciertas patologías del embarazo (Chim, 2008; Gilad, 2008; Miura, 2010; Kotlabova y cols., 2011; Dragos Cretoiu y cols., 2016).

Estudios en gestación normal han permitido identificar grupos de miRNAs cuyos niveles circulantes aumentan drásticamente durante el embarazo, tales como miR-141, miR-149, miR526, miR527, miR-424 y miembros del clúster C19MC (miR-517a, miR-518b, miR-518e y miR-524); éstos últimos detectados exclusivamente en gestantes (Chim, 2008; Gilad, 2008; Miura, 2010; Kotlabova u cols., 2011). En algunos de los estudios indicados, se llevaron a cabo comparaciones de cambios en los niveles circulantes de ciertos miRNAs (tales como miR-515, miR-517, miR-518, miR-526 y miR-323) entre finales del primer trimestre-inicio del segundo (entre 12 y 13 semanas) y tercer trimestre de la gestación (Miura, 2010).

En otros estudios, se correlacionaron cambios en los niveles circulantes de determinados miRNAs con ciertas patologías gestacionales. Por ejemplo, los niveles de diversos miRNAs están incrementados en casos de pre-eclampsia, entre los que se encuentra miR-210 (Prieto y Markert,, 2011). Del mismo modo, se ha documentado la supresión en los perfiles circulantes de miR-132, miR-29 y miR-222 durante el segundo trimestre como predictores del desarrollo de diabetes gestacional (Zhao y cols., 2011). Estos estudios, aún muy limitados en número, ilustran la posible utilidad de la detección de miRNAs circulantes como herramienta diagnóstica de determinadas patologías gestacionales.

### 1.3.5. MICRORNAs RELACIONADOS CON EL EMBARAZO ECTÓPICO

Como se indicó en secciones previas, hasta la fecha se han investigado diversos biomarcadores como la progesterona, la inhibina A, la activina A, la PAAP-A, para intentar conseguir un diagnóstico más precoz y preciso del EE del que podemos realizar en la actualidad, aunque su utilidad clínica es bastante limitada por dos razones principales. En primer lugar, las concentraciones séricas de estos varían en función de la edad gestacional. En segundo lugar, estos son capaces de discriminar entre EE y gestación de curso normal pero no permiten la distinción entre un EE y un aborto (Cartwright y cols., 2009). Sería un marcador ideal aquel que sea estable

y que permita la distinción entre EE y aborto. En este contexto, los miRNAs serían grandes candidatos a nuevos estudios por su estabilidad y su capacidad de pasar a la sangre periférica.

Zhao y cols. encontraron que las concentraciones circulantes de miR-323-3p y miR-525-3p permanecían estables a lo largo del embarazo. Además demostraron que los niveles de miR-323-3p eran significativamente más elevados en casos de EE que en casos de abortos o gestaciones evolutivas, lo cual permitiría discriminar entre los tres diagnósticos. En sus resultados encontraron que la determinación aislada del miR-323-3p proporcionaba para el diagnóstico del EE una sensibilidad del 37% para una especificidad del 90 %; en tanto que los marcadores empleados hoy en día como la hCG o la progesterona sólo alcanzaban una sensibilidad del 14,8 y 3,7%, respectivamente para dicha especificidad. Aún así, esta sensibilidad no sería suficiente y probablemente el uso de una combinación de múltiples marcadores podría ser la solución. Este mismo grupo consiguió una sensibilidad del 90 % para una especificidad del 80.7% cuando combinó hCG, progesterona, miR-323-3p, miR-525-3p, miR-517a y miR519d. Todos estos miRNAs están asociados al embarazo y aparecen rápidamente en la sangre materna durante al mismo y descienden rápidamente tras el parto (Miura y cols., 2010). Una alternativa para optimizar la sensibilidad podría ser el análisis por pasos llevado a cabo por Zhao y cols., con hCG, progesterona y miR-323-3p, que obtuvo una sensibilidad del 96,3% y una especificidad del 72,6%. Todos estos datos sugieren que el miR-323-3p puede ser un marcador útil incorporado en un sistema de múltiples marcadores para un diagnóstico más preciso y precoz del EE. Probablemente, tal como sugirieron Miura y cols., la secreción de este miRNA no sea exclusivamente por el tejido placentario, sino también por el tejido tubárico dañado o la inflamación peritoneal que genera esta patología.

Recientemente, en el hospital universitario de Nagasaki se ha llevado a cabo otro estudio sobre los niveles circulantes de miRNAs en casos de EE ( Miura y cols., 2015). Estos encontraron diferencias significativas de la expresión en plasma o suero materno de miRNAs asociados al embarazo (miR-323-p, miR-515-3p, miR-517a, miR- 517c y miR-518b) y de hCG en casos de EE, abortos espontáneos y embarazos normales. Sin embargo cuando se realizó el análisis de correlación entre los niveles de hCG y dichos miRNAs no se encontró ninguna relación. Por otro lado, al realizar el análisis estadístico univariante para cada miRNA, se obtuvieron diferencias en la expresión del miR-517a en EE y abortos espontáneos frente a gestaciones normales, pero solamente la expresión de miR-323-3p permitió distinguir entre EE y abortos espontáneos con un área bajo la curva de 0,7454 ( IC 95% (0,5558-0,9349), por tanto sin conseguir significación estadística.

Ellos abogan que probablemente la no significación estadística se deba al reducido tamaño muestral. Aún así, las tendencias de expresión observadas les hacen confiar en que con estudios

a largo plazo se pueda demostrar su valía como marcadores independientes del EE.

En otro estudio de casos y controles publicado recientemente por Domínguez y cols, constatan una expresión diferenciada y estadísticamente significativa de distintos miRNAs, tanto en tejido trofoblástico como en circulación materna periférica, en casos de EE frente a controles de similares edades gestacionales. Los controles que emplearon fueron interrupciones voluntarias del embarazo (IVE). Este grupo encontró que los niveles de cuatro miRNAs (hsa-miR-196b, hsa-miR-30a, hsa-miR-873, and hsa-miR-337-3p) eran claramente inferiores en los casos de EE frente a los controles, y otros tres miRNAs (hsa-miR-1288, hsa-miR-451, and hsa-miR-223) estaban significativamente elevados en los EE. Postulan que la alteración de estos siete miRNAs podría afectar a las vías críticas para la correcta implantación, como la remodelación de la matriz extracelular o la síntesis de mucinas, conllevando a una implantación anómala como ocurre en el EE.

#### 1.3.6. COMPLEJO LIN28/ Let-7

LIN28 es una proteína de unión a RNA (RNA binding protein) que ejerce función de control postranscripcional en diferentes dianas. Esta proteína fue aislada por primera vez en la especie *Caenorhabditis Elegans* donde demostró un papel fundamental en su desarrollo (Moss y cols., 1997). En mamíferos se han aislado dos genes relacionados con LIN28, el LIN28a y el LIN28b (Moss y Tang, 2003; Guo y cols., 2006; Balzer y Moss, 2007). Se ha visto que está implicado en el control de la síntesis de diversos miRNAs, especialmente de la familia let-7 a los que bloquea a través de la inhibición de la maduración de sus precursores (Heo y cols., 2008; Viswanathany cols., 2008) (ver figura 10). Además, es capaz de unirse a diversos mRNAs convencionales, como aquellos que codifican la proteína IGF2 (Balzer y Moss, 2007; Poleskaya y cols., 2007), el factor de pluripotencialidad OCT4 (Qiu y cols., 2010), y la histona H2a (Xu y Huang, 2009), así como, a múltiples reguladores del ciclo celular, como las ciclinas A y B y el CDK4 (Xu y cols., 2009). En cualquier caso, esta habilidad para unirse tanto a miRNAs como a mRNAs convencionales les confiere un amplio espectro de dianas de actuación y la capacidad de regular múltiples procesos. Esta familia de proteínas está ampliamente expresada durante la etapa del desarrollo embrionario, pero durante la edad adulta se restringen a determinados tejidos (Yang y Moss, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que actúan como factores de pluripotencialidad celular. Así, junto con OCT4, SOX 2 y NANOG, actúan en la reprogramación de células humanas somáticas en células madre pluripotentes (Yu y cols., 2007). En otros estudios se han relacionado con la edad de la menarquía (He y cols., 2009; Yan y cols., 2009; Wu y cols., 2012; Tong y cols.,

2012), el desarrollo mamario y la talla adulta (Phillips y cols., 2010) y probablemente junto con la familia Let -7 tengan implicación en la regulación de la pubertad (Sangiao y cols., 2013).

La familia Let-7 abarca un grupo de nueve miRNAs (Let-7a hasta Let-7i), codificados por dos clusters de genes (uno que codifica para Let-7a, Let-7c y Let-7f; otro que codifica para Let-7b, Let-7d, Let-7e, Let-7g, Let-7i) cuya maduración se encuentra bajo el control represor de Lin28B (Heo y cols., 2008; Viswanathany cols., 2008), y cuya expresión es a su vez regulada por otros miRNAs (p.ej., mir-132 y mir-145), y diversos factores transcripcionales, tales como c-Myc (figura 10). Los miRNAs de la familia Let-7 habían sido catalogados como supresores de tumores (Esquela-Kerscher y cols., 2008), de hecho diversos oncogenes como c-myc, Ras y Cdk 6 son dianas conocidas de los Let-7 mi-RNAs. Además, participan en el control de la pluripotencialidad, proliferación y diferenciación celular (Bussing y cols., 2008; Boyerinas B y cols., 2010).

Un estudio reciente investigó la expresión del sistema LIN 28/ Let-7 en tejido humano gestacional en el embarazo a término. Su hipótesis era que la cascada de inflamación que se activa durante el parto debía producir un aumento de LIN28 y un descenso de Let-7, por lo que elaboraron un estudio de casos (tejido placentario de mujeres que se habían puesto de parto) y controles (cesáreas programadas sin pródromos de parto). No encontraron diferencias significativas en este sentido. Lo que sí observaron fue que estos miRNAs son específicos de cada tejido, ya que obtuvieron expresión alta de LIN28 en la placenta y el corion, y esta era ausente en el amnios. Sin embargo, la expresión de Let-7b y c era más baja en el corion que en la placenta y en el amnios (Chan y cols., 2013).

Dado que no hay publicaciones de casos y controles sobre los cambios en el patrón de expresión de los miRNAs en tejido de EE y menos aún en concreto del sistema LIN28/Let-7, y que existen escasos estudios que se hayan centrado en el comportamiento de la expresión de los miRNAs en fases precoces de la formación placentaria, nos pareció interesante desarrollar este estudio para conocer el papel del sistema LIN28/Let-7 y algunos miRNAs asociados en el tejido placentarios de embarazos normales frente a ectópicos.

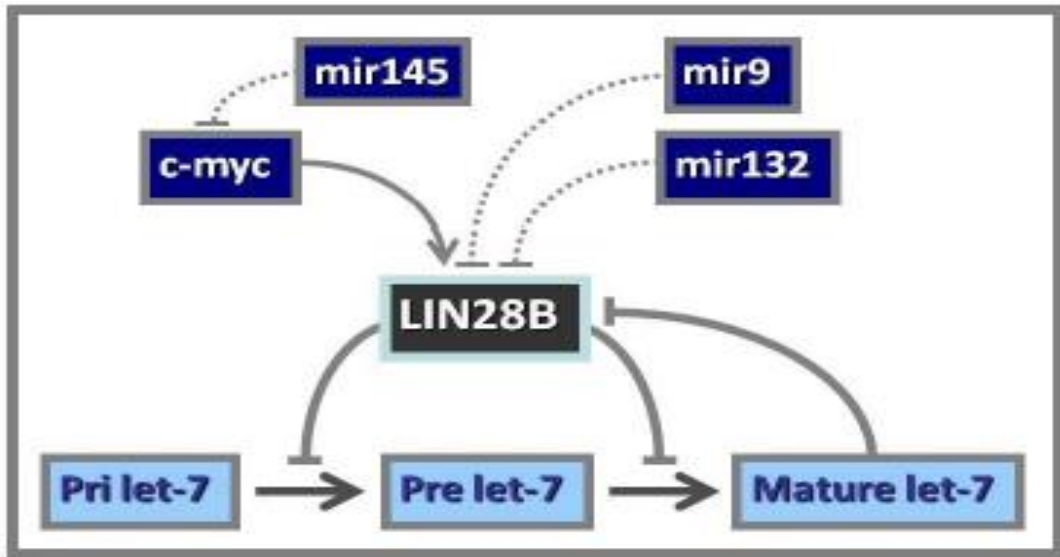


Figura 10: Sistema de regulación de la maduración de la familia Let-7.

# 02

---

## HIPÓTESIS

---

## *2. HIPÓTESIS*

---

En la regulación de los procesos biológicos actúan diversos sistemas, entre ellos, los mecanismos epigenéticos a través de los miRNAs. Estos pequeños fragmentos de RNA no codificante están siendo activamente estudiados en la actualidad ya que variaciones en sus niveles se están relacionando con distintas patologías. En la actualidad se han identificado miRNAs implicados en las vías de regulación y desarrollo de la invasión tumoral, proceso que tiene muchos aspectos en común con la invasión placentaria del endometrio; por ello, cabe esperar que existan miRNAs implicados también en este proceso. Así mismo, existen ya estudios sobre miRNAs expresados específicamente en el embarazo y que han constatado diferencias de expresión al comparar gestaciones normales con patológicas.

Por tanto, la hipótesis principal planteada en esta tesis doctoral se basa en el hecho de que en situaciones donde ocurre una implantación anómala, como sucede en el embarazo ectópico, el nivel de expresión de miRNAs y en concreto del complejo LIN 28/Let- 7 en el tejido embrionario, sea diferente al hallado en gestaciones normales.

# 03

---

## OBJETIVOS



---

### 3. OBJETIVOS

---

Nuestros objetivos principales en esta tesis fueron los siguientes:

1. Identificar el perfil global de expresión de LIN28/Let -7 y miRNAs asociados (miR-132, miR-145 y mir-323-3p) en tejido embrionario procedente de gestaciones evolutivas sanas con interrupción voluntaria del embarazo en el primer trimestre de la gestación.
2. Identificar el perfil global de expresión de LIN28/Let -7 y miRNAs asociados (miR-132, miR-145 y mir-323-3p) en tejido embrionario procedente de gestaciones ectópicas tubáricas.
3. Comparar y validar el perfil global de expresión de LIN28/Let -7 y miRNAs asociados (miR-132, miR-145 y mir-323-3p) en tejido embrionario procedente de gestaciones ectópicas tubáricas y de gestaciones evolutivas sanas con interrupción voluntaria del embarazo en el primer trimestre de la gestación.

# 04

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. APROBACIÓN DEL ESTUDIO POR EL COMITÉ ÉTICO

Este estudio de casos y controles fue aprobado tras la presentación y justificación del proyecto por el comité de ética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, de Valencia, España.

Las partes del estudio realizadas con pacientes humanos y la recogida de muestras se llevaron a cabo de conformidad a las normas sobre experimentación humana dimanantes del código de Nuremberg (1947), declaraciones de Helsinki (1964), Sidney (1968), Tokio (1975), Venecia (1983), Hong-Kong (1989) y complementarias, directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20/10/99) y Código de ética y Deontología Médica vigente.

Las muestras biológicas fueron recogidas en el momento en que las pacientes fueron sometidas a la cirugía dentro de su proceso terapéutico previsto tras la firma del consentimiento informado. En ningún caso se llevó a cabo ningún procedimiento quirúrgico que tuviera como objetivo exclusivo o prioritario la toma de estas muestras.

### 4.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se incluyeron en el estudio pacientes procedentes del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, diagnosticadas e intervenidas de gestación ectópica por métodos convencionales, previa confirmación del cumplimiento de los criterios de inclusión y firma del correspondiente consentimiento informado (anexo 1). De igual forma se incluyeron en el estudio pacientes con embarazos normales libres de patología de la implantación que decidían interrumpir voluntariamente la gestación y que aceptaban las condiciones del estudio mediante la firma del consentimiento informado y que cumplían los criterios de inclusión.

Se seleccionaron 43 pacientes con gestaciones intrauterinas normales que habían decidido someterse a una interrupción voluntaria del embarazo (IVE) y 17 pacientes diagnosticadas de EE tubárico (figura 11). Se recogieron los siguientes datos de las pacientes: edad, fórmula gestacional,

hábito tabáquico, antecedentes de aborto previo, factores de riesgo del EE (antecedente de una infección pélvica, historia de infertilidad, uso de anticonceptivo con gestágenos o el uso de dispositivos intrauterinos). Los casos de EE fueron diagnosticados mediante ecografía transvaginal y la determinación seriada de  $\beta$ -hCG en sangre. Este era finalmente confirmado con la laparoscopia que servía de diagnóstico definitivo al mismo tiempo que para su tratamiento.

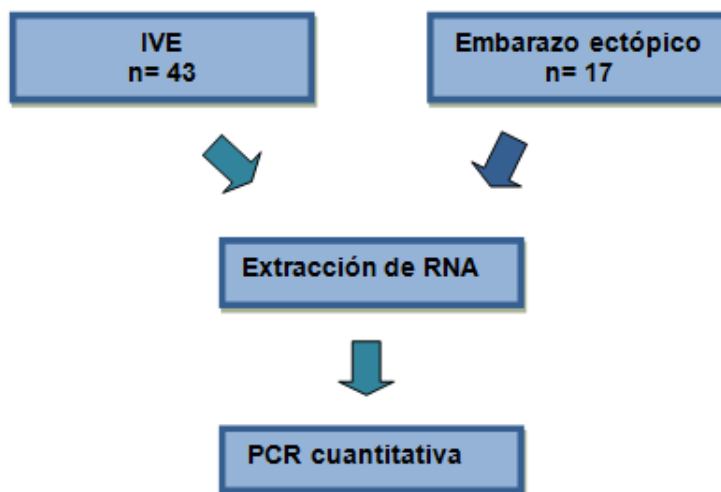


Figura 11: Tamaño muestral y procedimientos de laboratorio.

#### 4.2.1. CASOS: CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Las mujeres seleccionadas para formar parte del grupo de estudio fueron todas aquellas mujeres mayores de 18 años de edad que fueron diagnosticadas de EE tubáricos mediante ecografía y determinación seriada de  $\beta$ hCG y sometidas a una salpinguectomía laparoscópica para su resolución, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe en el periodo entre 2011 y 2013. Previamente debían comprender y aceptar la participación del estudio mediante la firma del consentimiento informado correspondiente.

#### 4.2.2. CASOS: CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio a todas aquellas mujeres que presentaban patología psiquiátrica o cognitiva que impidiera la comprensión de las condiciones del consentimiento informado. Otros casos que no se consideraron aptos para participar fueron todo tipo de embarazos evolutivos o cualquier otra patología gestacional que no se tratase de una gestación ectópica. Así mismo, las pacientes que cumplían criterios de tratamiento médico con metrotexate ( $\beta$ hCG entre 1500-5000 mUI/ml, ausencia de latido cardiaco, estabilidad hemodinámica y diámetro del saco gestacional menor de 40 mm) y que optasen por esta opción terapéutica fueron inmediatamente descartadas, aunque finalmente se sometieran a tratamiento quirúrgico por fracaso del tratamiento con metrotexate quedaban excluidas del estudio.

#### 4.2.3. CONTROLES: CRITERIOS DE INCLUSIÓN

El grupo control se formó con pacientes mayores de edad con gestaciones normales intrauterinas que se sometían a una interrupción voluntaria del embarazo amparándose a la libre interrupción de la gestación hasta la semana 14 y que aceptasen las condiciones del estudio mediante la firma del consentimiento informado correspondiente.

#### 4.2.4. CONTROLES: CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Quedaron excluidas para formar parte del grupo control las pacientes con cualquier tipo de patología placentaria, los casos de sospecha de malformaciones fetales, las gestaciones gemelares y obviamente las mujeres con patología psiquiátrica o cognitiva que impidiese la comprensión de las condiciones del consentimiento informado.

### **4.3. RECOGIDA, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Las muestras se comenzaron a recoger una vez obtuvimos la aprobación del estudio por el comité ético del Hospital Universitario y Politécnico la Fe.

Tras la firma del consentimiento informado correspondiente en cada caso se procedió a la recogida de muestras de placentas de gestaciones normales (controles) y gestaciones ectópicas (casos) en el curso de procedimientos terapéuticos reglados. El procesamiento de las mismas se realizó según la normativa vigente.

Las muestras del grupo de los casos se recogieron durante la intervención quirúrgica vía laparoscópica prevista para su tratamiento. Se emplearon 4 trocares: uno de 10 mm umbilical o infraumbilical según el criterio del cirujano para la introducción de la cámara, otro de 10 mm en la fosa iliaca derecha (FID) y dos trocares de 5 mm en localizaciones suprapúbica y e iliaca izquierda. Se realizó en todos los casos una salpinguectomía unilateral de la trompa afectada mediante corte y coagulación bipolar con una distancia de seguridad a ambos lados del EE de mínimo 1 cm. La pieza era extraída en una bolsa de extracción laparoscópica (endobag) a través del puerto de 10 mm situado en FID. Tras esto uno de los investigadores colaboradores del estudio que estaba presente en el quirófano procedía a la obtención de la muestra. Este realizaba una incisión longitudinal en la parte antimesentérica de la trompa y aplicaba presión de forma sutil con dos dedos para extraer el tejido embrionario. Dicho tejido se separaba cuidadosamente de los coágulos y del tejido tubárico bajo visión con un estereomicroscopio. El tejido seleccionado (0'5-2 cm de placenta), se introducía en tubos de eppendorf rellenos con Trizol® y posteriormente eran congelados a -80 °C hasta ser cuantificados. Un pequeño fragmento de la pieza se enviaba para estudio anatomopatológico y confirmación del diagnóstico histológico. En el caso de los IVE 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 la misma forma que los EE y se colocaron inmediatamente en el reactivo Trizol®, para ser congeladas y almacenadas a -80° hasta ser cuantificadas.

## **4.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA**

### **4.4.1. AISLAMIENTO DE mRNA/miRNA**

La extracción de ARN total de las muestras (en la cual se incluyen los miRNAs) se realizó usando el agente trizol® (Invitrogen, CA) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (protocolo de Chomczynski y Sacchi, 1987). Después del TRIzol®, se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de TRIzol® utilizado en origen. Se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 15 segundos y se dejó reposar 2-3 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 12000 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 15 min a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de TRIzol® empleado al inicio. Se dejó precipitar 10 min a temperatura ambiente o durante toda la noche a -20°C y tras otra centrifugación a 12000 r.p.m durante 15 min a 4°C se obtuvo un precipitado de ARN. Este pellet se lavó con etanol al 70% en agua DEPC (dietil pirocarbonato) y se volvió a centrifugar por última vez a 7500 r.p.m durante 5 min a 4°C. Finalmente se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC.

Terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a cuantificar la concentración de ARN total y a valorar la calidad del mismo midiendo por espectrofotometría. Para ello se empleó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific) y la presencia, la proporción, y la calidad de los miRNAs se evaluaron con pequeños RNA LabChips y Bioanalyzer (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE RNAS MENSAJEROS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (Q-PCR) O CUANTITATIVA**

En el caso del análisis de los RNA mensajeros, se procedió a retrotranscribir el ARN obtenido a ADN complementario (ADNc) para posteriormente poder analizarlo por Q-PCR. La retro-transcripción (RT) en una reacción de 30 µl se realizó mediante iScript™ Transcripción

inversa super-mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

La Q-PCR en tiempo real (real time PCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). En este caso se realizó la Q-PCR con Bio-rad SFX96TM Real-Time System (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, California) para amplificar los mRNAs objetivos.

Para la cuantificación del ARNm de LIN28b y L19 (housekeeping gene o gen reportero) en muestras de la placenta, se trató 1 µg de ARN total por muestra de tejido con RNasa libre de DNasa-I (Promega, Madison, Wyoming) y la retro-transcripción (RT) se realizó en una reacción de 30 µl se realizó mediante iScript™ Transcripción inversa super-mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

Para la amplificación por Q-PCR, se utilizó SYBR Green qPCR Master Mix (Promega) con las secuencias de cebadores que se muestran en la tabla 4.

<b>MicroRNA</b>	<b>Primer empleado para amplificar</b>
<i>hL19-forward</i>	5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3'
<i>hL19-reverse</i>	5'-ACCTTCAGGTACAGGCTGTG-3'
<i>hLIN28B-forward</i>	5'-CATCTCCATGATAAACCGAGAGG-3'
<i>hLIN28B-reverse</i>	5'-GTTACCCGTATTGACTCAAGGC-3'

Tabla 4: Tabla donde se representan los cebadores específicos usados para los genes utilizados en nuestros estudios.



La PCR se realizó comenzando por un ciclo de 95 ° C durante 2-minutos, seguido por 35 ciclos de 15-segundos a 95 ° C, 30-segundos a 62 ° C, y 10 segundos-a 72 ° C, seguido de un ciclo final de 72 ° C durante 1 minuto. L19 se empleó como control interno para la eficiencia de la reacción y la carga de la muestra. Los niveles relativos de los mRNAs se normalizaron con los niveles de expresión de transcripción del control interno.

#### 4.4.3. RETROTRASCRIPCION Y AMPLIFICACION DE miRNAS POR Q-PCR

El sistema más comúnmente empleado para la detección de miRNAs específicos es la qPCR. Una reacción a tiempo real para miRNAs comienza con la transcripción inversa de RNA a cDNA. La longitud limitada de los miRNA (unos 22 nucleótidos), la falta de una característica común, como una secuencia de poli {A} en la cola y el hecho de que la secuencia de los miRNAs maduros también está presente en el pri y el pre miRNA generan dificultades para realizar la retrotranscripción. En nuestro trabajo los miRNAs fueron transcritos individualmente mediante el empleo de cebadores específicos mediante el sistema stem loop RT.

Estos cebadores están diseñados para tener una región corta de una sola cadena que es complementaria a la secuencia conocida en el extremo 3' de los miRNA, una parte de doble cadena (stem) y el bucle (loop) que contiene la secuencia de unión al cebador universal TaqMan MicroRNA RT ( Applied Biosystems, Foster City, CA).

Se cuantificaron los miRNA, let-7a, miR-145, 132-miR y miR-323-3p (ver esquema en Sangiao-Alvarellos et al. Endocrinology 2013). El cDNA se sintetizó usando 10 ng de RNA total con TaqMan-specific RT primers y el TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, California).

La mezcla para la reacción (15µl) de retrotranscripción se realizó en un termociclador (iCycler iQ®5; Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) con las siguientes condiciones: 16 ° C durante 40 min, 42 ° C durante 40 min y 85 ° C durante 5 min. Una vez finalizada la RT, el volumen de reacción se diluyó con agua libre de nucleasa hasta obtener un volumen final de 215µl. El cDNA resultante se empleó como molde para la qPCR.

A partir de aquí, la PCR cuantitativa se realizó mediante ensayos prediseñados para let-7a, mir-145, mir-132 y RNU6 (Applied Biosystems). Para la determinación cuantitativa de los miRNAs se usó el gen RNU6 como referencia interna.

Cada reacción de PCR contenía 1,33µl del producto de la RT {dilución 1:15} y los siguientes reactivos (Applied Biosystems):

- 1 µl de TaqMan® Small RNA Assay 20X
- 10 µl de TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix {No AmpErase®UNG}
- 7.67 µl de Nuclease-free water

El volumen final obtenido de la reacción de PCR fue de 20µl. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: i} 2 min a 50 ° C; ii} 10 min a 95 ° C y iii} 40 ciclos de 15 segundos a 95 ° C y 1 min a 60 ° C. Los análisis de datos se llevaron a cabo de la misma manera que para los mRNA pero, en este caso, RNU6 se utilizó como referencia interna.

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados sobre niveles hormonales se presentan como media ± SEM. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional (para los estudios sobre los perfiles de expresión en los embarazos normales en las que la variable como la edad gestacional) o ANOVA bidireccional (para la comparación de los niveles de expresión en función de la edad gestacional o de la placentación ectópica), con el fin de detectar diferencias entre los grupos. En los casos en que se encontraron interacciones significativas, los datos fueron analizados utilizando comparaciones post hoc, utilizando pruebas de Newman-Keuls, con el fin de identificar los efectos simples. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos del paquete de software Prism GraphPad- (La Jolla, CA, EE.UU.). Un P-valor ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

# 05

---

## RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el grupo control la media de edad fue claramente inferior (21,1 años) que en los casos de EE (30,9 años) aunque esta diferencia no fue significativa. En cuanto al número de gestaciones previas totales (2,1 en los casos y 2 en los controles) y el número de nacimientos (0,5 en los dos grupos) esta cifra fue similar en ambos grupos de estudio. También fue parecida la media de abortos anteriores (tabla 5).

Como era de esperar, el número de EE previos fue mayor en los casos, 11,8% frente al 2,9% en los controles. Así mismo, sucedió con el antecedente de cirugía abdominal y/o pélvica previa (35,3% en los casos y 11,8% en los controles) y con la historia previa de infertilidad (11,6% en los casos y 0% en los controles). También tuvo un similar comportamiento la frecuencia del uso de cualquier tipo de anticonceptivo con gestágenos, siendo esta mayor en el grupo de los casos (tabla 6). En cuanto al hábito tabáquico, este fue más frecuente en el caso de los controles.

	Edad	Gravidez	Paridad	AP de abortos espontáneos o voluntarios	Número de abortos	AP EE
EE	30,9	2,1	0,5	35,3%	0,5	11,8
Control	21,1	2	0,5	38,2%	0,4	2,9

**Tabla 5:** Características de la población a estudio pertenecientes a ambos grupos (EE y controles).

	AP de cirugía abdominal o pélvica	AP de esterilidad	Usaria de DIU o anticoncepción con gestágenos	Fumadora
EE	35,3%	11,5%	5,9%	23,5%
Control	11,9%	0%	2,9%	47,1%

**Tabla 6:** Características de la población a estudio pertenecientes a ambos grupos (EE y controles).

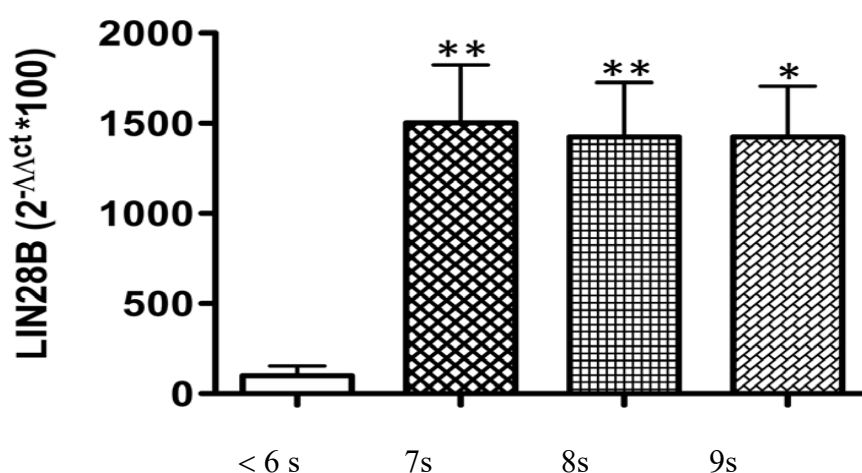
## **5.2. EXPRESIÓN DE LIN28B Y miRNAs RELACIONADOS EN TEJIDO PLACENTARIO DURANTE GESTACIONES HUMANAS NORMALES EN ESTADÍOS PRECOCES**

Se estudiaron los niveles de expresión del mRNA de LIN28B y diversos miRNAs relacionados en el tejido embrionario durante etapas precoces del embarazo. En concreto, se analizaron muestras de placenta obtenidas de mujeres que se sometieron a IVE entre las semanas 5 y 9 de amenorrea. Debido al escaso número de muestras disponibles en fases muy precoces y con objetivo de aumentar el poder estadístico, las muestras entre las semanas 5 y 6 se introdujeron en un mismo grupo para realizar el análisis estadístico. A este grupo se hará referencia como gestaciones menores o iguales a 6 semanas ( $\leq 6$  semanas).

Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los niveles de expresión fueron analizados cuantitativamente mediante el método de cuantificación relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) y fueron normalizados con el grupo de referencia  $\leq 6$  semanas. Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2005a). Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay software que puede determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Dorak, 2008). Los cálculos en cuantificación relativa de expresión génica se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak & Schmittgen, 2001). Este es el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que sólo es aplicable para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión genética en estudio. El método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control.

Se observó que los niveles relativos de LIN28B en tejido embrionario de gestaciones humanas precoces fueron casi nulos en gestaciones  $\leq 6$  semanas, produciéndose una diferencia estadística en su expresión en semanas posteriores. De hecho, se detectó un pico muy marcado de sus niveles a partir de la semana 7 para posteriormente mantenerse en meseta hasta las 9 semanas (figura 12).

Al comparar la expresión en gestaciones por debajo de las 6 semanas de amenorrea con los otros subgrupos (amenorrea de 7, 8 y 9 semanas) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ) (figura 12). Para ello se aplicó el test de ANOVA unidireccional seguido de test de Newman Keuls.



**Figura 12: Perfil de expresión de LIN28B en la placentación normal durante periodos gestacionales precoces.** Se representan los niveles de expresión de LIN28B en función de la semana gestacional en forma de medias  $\pm$ SEM y la significación estadística obtenida al comparar la expresión de LIN28B en gestaciones por debajo de las 6 semanas de amenorrea con los otros subgrupos (amenorrea de 7, 8 y 9 semanas). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs valores en las muestras  $\leq 6$  semanas.

Con la expresión del miRNA Let- 7a sucedió justamente lo contrario. Su expresión fue máxima en tejido embrionario  $\leq 6$  semanas para a partir de la semana 7 experimentar una bajada drástica y mantenerse en niveles mínimos hasta la semana 9 (figura 13). Asimismo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de Let-7a en gestaciones  $\leq 6$  semanas y embarazos de 7, 8 y 9 semanas (figura 13).

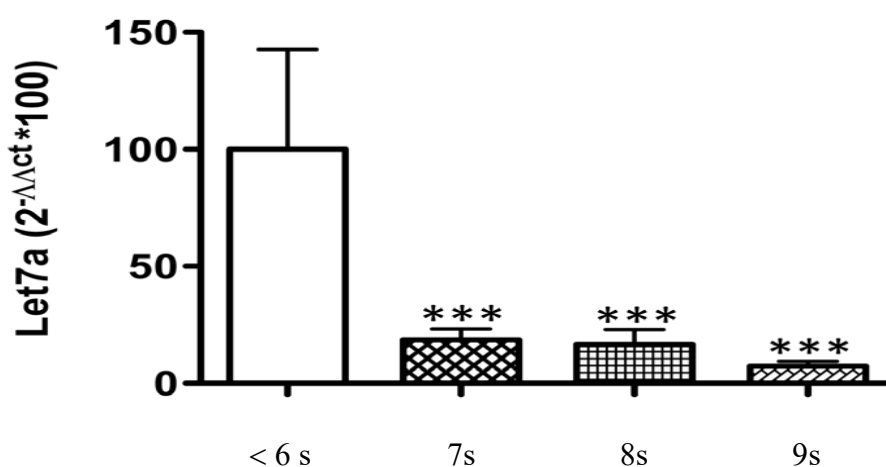


Figura 13: Perfil de expresión de Let-7a en la placentación normal durante periodos gestacionales precoces. Se representan los niveles de expresión de Let-7a en función de la semana gestacional en forma de medias  $\pm$ SEM y la significación estadística obtenida al comparar la expresión de Let-7a en gestaciones por debajo de las 6 semanas de amenorrea con los otros subgrupos (amenorrea de 7, 8 y 9 semanas). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs valores en las muestras  $\leq 6$  semanas.

Se objetivó un comportamiento similar al Let-7a en los casos de miR-132 y miR-145, aunque el descenso en la expresión a partir de la séptima semana en este caso fue más gradual. Los niveles de Let-7a en la semana 7, habían descendido al 80% de su valor máximo, en tanto que para miR-132 y miR-145 habían descendido aproximadamente a la mitad en esta semana (figuras 14 y 15).

En el caso de miR-132 todas las comparaciones realizadas por subgrupos fueron significativas con respecto al grupo de menos de 6 semanas. Sin embargo, las diferencias de expresión de miR-145 sólo alcanzaron niveles significativos al comparar embarazos de  $\leq 6$  semanas con embarazos de 8 semanas (figura 14), aunque se vieron las mismas tendencias a la baja que en el caso de miR-145.

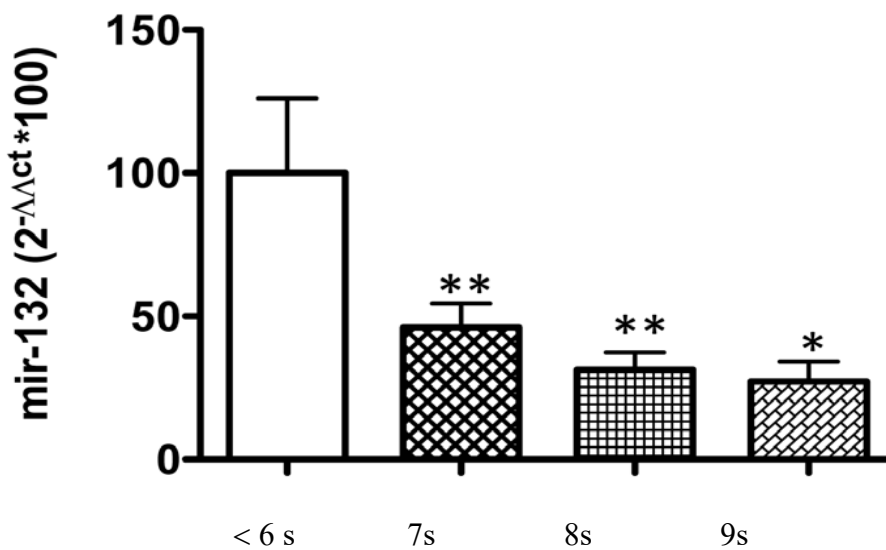
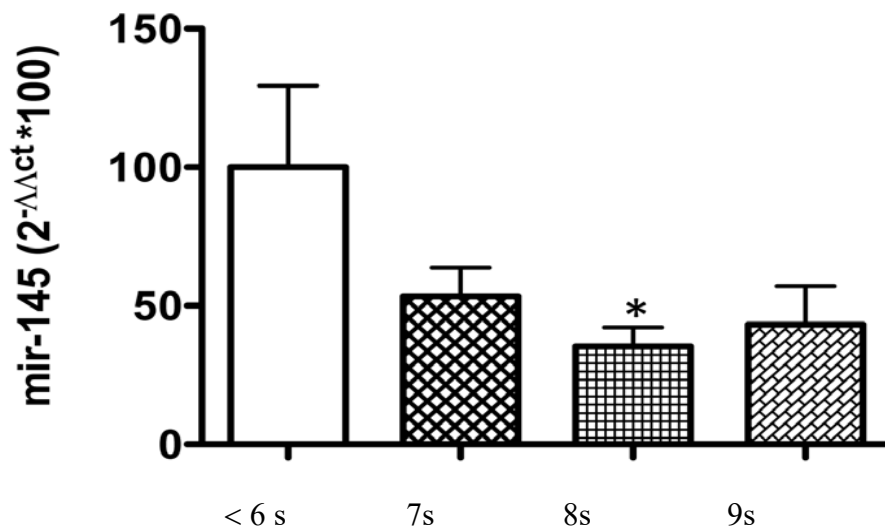


Figura 14: Perfil de expresión de miR-132 en la placentación normal durante periodos gestacionales precoces. Se representan los niveles de expresión de miR-132 en función de la semana gestacional en forma de medias  $\pm$ SEM y la significación estadística obtenida al comparar la expresión de miR-132 en gestaciones por debajo de las 6 semanas de amenorrea con los otros subgrupos (amenorrea de 7, 8 y 9 semanas). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs valores en las muestras  $\leq 6$  semanas.





**Figura 15: Perfil de expresión de miR-145 en la placentación normal durante períodos gestacionales precoces.** Se representan los niveles de expresión de miR-145 en función de la semana gestacional en forma de medias  $\pm$ SEM y la significación estadística obtenida al comparar la expresión de miR-145 en gestaciones por debajo de las 6 semanas de amenorrea con los otros subgrupos (amenorrea de 7, 8 y 9 semanas). \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 vs valores en las muestras  $\leq$  6 semanas.

Por otro lado, se observó una tendencia similar a LIN28B en la expresión de miR-323-3p, aunque no hubo un ascenso tan brusco de su expresión en la semana 7. Los niveles fueron mínimos en tejido embrionario de  $\leq$  6 semanas y ascendieron posteriormente hasta alcanzar su máximo nivel a las 9 semanas. Sin embargo, al hacer comparaciones entre la expresión en las distintas semanas de gestación tomando como referencia las de  $\leq$  6 semanas, la diferencia no fue significativa (figura 16).

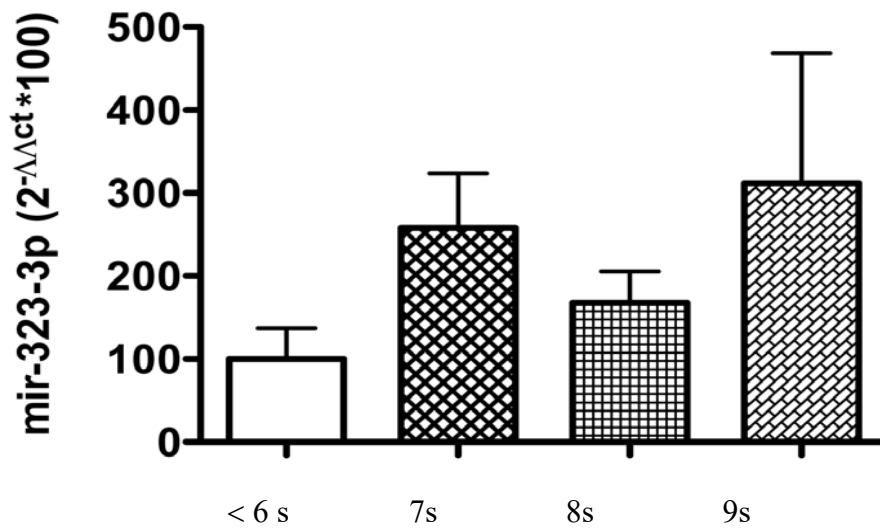


Figura 16: Perfil de expresión de miR-323-p en la placentación normal durante periodos gestacionales precoces. Se representan los niveles de expresión de miR-323-p en función de la semana gestacional en forma de medias  $\pm$ SE y la significación estadística obtenida al comparar la expresión de miR-323-p en gestaciones por debajo de las 6 semanas de amenorrea con los otros subgrupos (amenorrea de 7, 8 y 9 semanas). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs valores en las muestras  $\leq$  6 semanas.

### 5.3. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE LIN28B miRNAs RELACIONADOS EN EL TEJIDO PLACENTARIO DE EMBARAZOS ECTÓPICOS Y DE GESTACIONES HUMANAS NORMALES PRECOCES

La expresión de los miRNAs arriba enumerados fue analizada también en tejido embrionario procedente de embarazos ectópicos. Aunque las muestras se analizaron de forma separada, con el objetivo de incrementar el poder estadístico de nuestro análisis se crearon dos subgrupos para compararlos entre ellos, el de  $\leq 6$  semanas y el de 7-9 semanas. Esto nos permitió aumentar el número de casos en cada grupo. Para realizar los grupos nos basamos en tendencias observadas en el análisis de muestras individuales.

Los niveles están expresados en forma de media  $\pm$  SEM y fueron analizados cuantitativamente mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Posteriormente se normalizaron los resultados con el grupo de referencia  $\leq 6$  semanas del grupo control y para hacer las comparaciones entre los distintos grupos se aplicó el test de ANOVA bidireccional seguido del test de Newman-Keuls ( $**P < 0,01$  vs niveles en muestras control que nos muestra el efecto del EE; a,  $P < 0,01$  vs niveles en las muestras  $\leq 6$  semanas que nos muestra el efecto de la edad gestacional).

El análisis de expresión por subgrupos confirmó que el nivel de miRNA LIN28B se incrementa casi 4 veces su valor en tejido embrionario normal, entre las  $\leq 6$  semanas comparado con fases posteriores (7-9 semanas) del embarazo en etapas tempranas (figura 17). Sin embargo, en las fases más precoces ( $\leq 6$  semanas) en los EE se observó una expresión del ARNm de LIN28B drásticamente superior a la del grupo control, siendo esta estadísticamente significativa. Sin embargo, esta diferencia desaparecía en fases más tardías del embarazo (7-9 semanas) (figura 17). Por otra parte, en línea con los resultados previos, detectamos un descenso sustancial en los niveles del miRNA Let-7a en el tejido embrionario de gestaciones tempranas normales, entre  $\leq 6$  semanas y etapas posteriores (figura 18), mientras que en el tejido embrionario patológico del EE, la expresión de Let-7a presentaba niveles mínimos de expresión ya en el grupo de  $\leq 6$  semanas y se mantenía en niveles similares en etapas más avanzadas (figura 18).

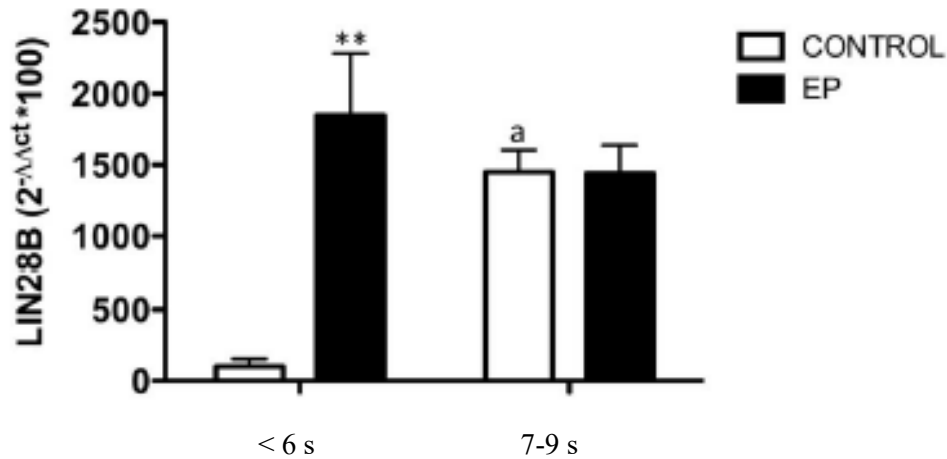


Figura 17: Diferencias de expresión de LIN28B entre tejido embrionario de EE y controles en fases precoces del embarazo. Los datos se presentan en forma de medias  $\pm$ SEM. \*\* $P < 0,01$  vs niveles en muestras control (efecto del EE); a,  $P < 0,01$  vs niveles en las muestras  $\leq 6$  semanas (efecto de la edad gestacional).

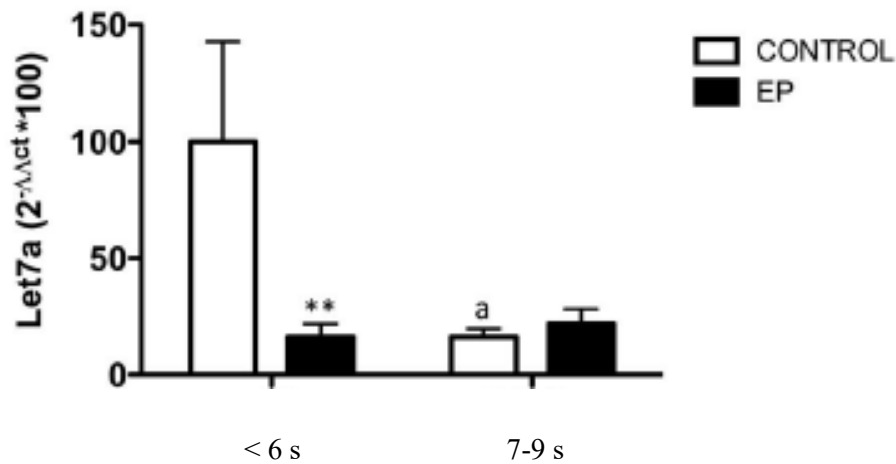


Figura 18: Diferencias de expresión de Let-7a entre tejido embrionario de EE y controles en fases precoces del embarazo. Los datos se presentan en forma de medias  $\pm$ SEM. \*\* $P < 0,01$  vs niveles en muestras control (efecto del EE); a,  $P < 0,01$  vs niveles en las muestras  $\leq 6$  semanas (efecto de la edad gestacional).

Se realizaron análisis similares para los otros miRNAs estudiados en este trabajo. La expresión de miR-132 y miR-145 se reducía al comparar gestaciones  $\leq 6$  semanas con fases posteriores de embarazos precoces. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar gestaciones normales con ectópicas (figuras 19 y 20). En el caso de mir-145 se observó una expresión aumentada en EE antes de las 6 semanas pero no fue estadísticamente significativa.

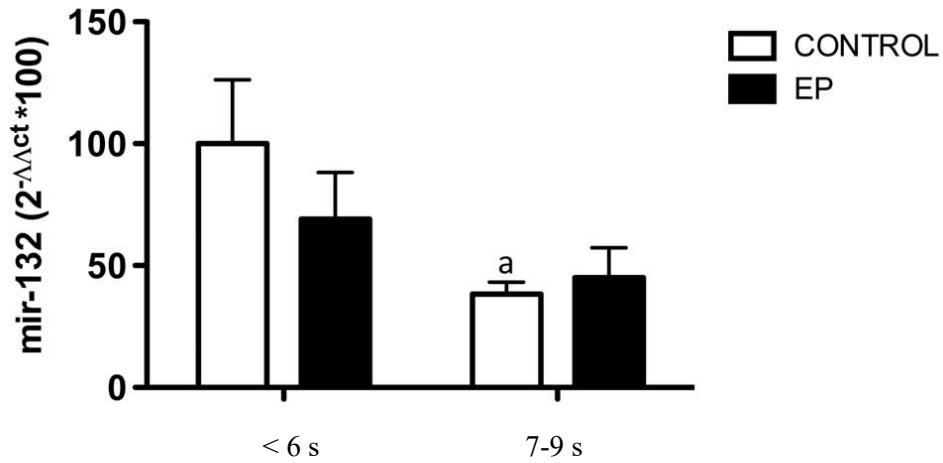


Figura 19: Diferencias de expresión de miR-132 entre tejido embrionario de EE y controles en fases precoces del embarazo. Los datos se presentan en forma de medias  $\pm$ SEM. \*\*P < 0,01 vs niveles en muestras control (efecto del EE); a, P < 0,01 vs niveles en las muestras  $\leq$  6 semanas (efecto de la edad gestacional).

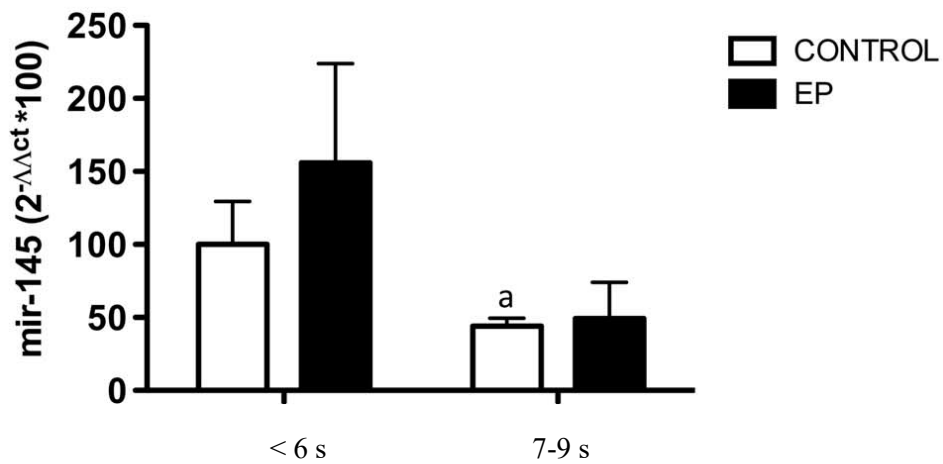
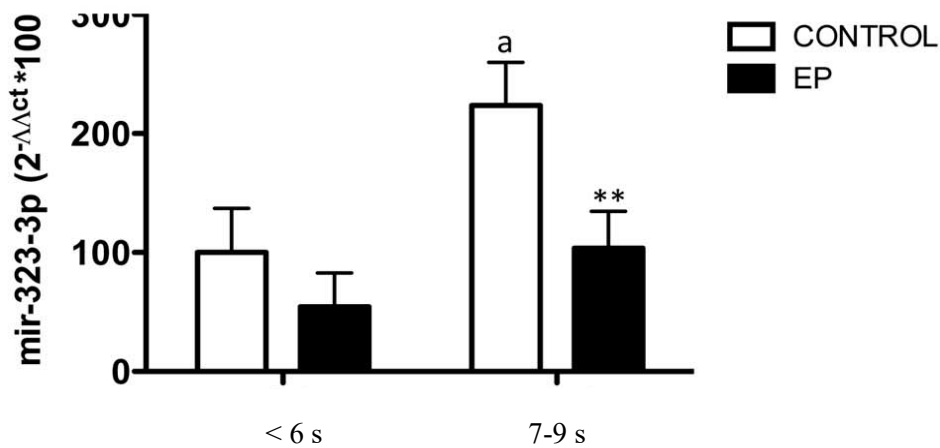


Figura 20: Diferencias de expresión de miR-145 entre tejido embrionario de EE y controles en fases precoces del embarazo. Los datos se presentan en forma de medias  $\pm$ SEM. \*\*P < 0,01 vs niveles en muestras control (efecto del EE); a, P < 0,01 vs niveles en las muestras  $\leq$  6 semanas (efecto de la edad gestacional).

Por el contrario los niveles de miR-323-3p, en tejido embrionario normal tendieron a ascender entre  $\leq 6$  semanas y fases más tardías. Esta diferencia fue significativa cuando se realizó el análisis por subgrupos entre gestaciones  $\leq 6$  semanas y entre 7-9 semanas. Curiosamente, los niveles de miR-323-3p en EE fueron similares en embarazos  $\leq 6$  semanas. Sin embargo, el incremento de su expresión en fases más tardías (semanas 7-9) no se obtuvo en los EE, por lo que entre las semanas 7 y 9, la expresión de miR-323-3p en tejido embrionario de EE quedaba por debajo de la del embarazo normal (figura 21).



**Figura 21: Diferencias de expresión de miR-323-p entre tejido embrionario de EE y controles en fases precoces del embarazo.** Los datos se presentan en forma de medias  $\pm$ SEM. \*\* $P < 0,01$  vs niveles en muestras control (efecto del EE); a,  $P < 0,01$  vs niveles en las muestras  $\leq 6$  semanas (efecto de la edad gestacional).

# 06

---

## DISCUSIÓN

---

## *DISCUSIÓN*

---

El embarazo ectópico es una patología asociada al embarazo relativamente frecuente. Además, su incidencia global, lejos de reducirse con el desarrollo de la medicina, ha aumentado, alcanzando a principios de los años noventa una cifra aproximada de 20 por cada 1000 embarazos (Bouyer y cols., 2003). Se trata pues, de la principal causa de mortalidad en etapas tempranas del embarazo y una de las urgencias quirúrgicas más frecuentes del primer trimestre de la gestación (Creanga y cols., 2011).

El EE no es solo una causa importante de morbilidad y mortalidad asociada al riesgo de ruptura y hemorragia intraabdominal, sino que puede generar secuelas graves en la vida reproductiva femenina, incluyendo el embarazo ectópico recurrente y la infertilidad (Farquhar y cols., 2005; Rana y cols., 2013). Aún con todo esto, no existen hoy en día herramientas que permitan un diagnóstico con la precocidad y precisión necesaria para conseguir evitar sus repercusiones. Actualmente, para su detección se requieren visitas periódicas al especialista para realizar un control ecográfico y la determinación seriada de la  $\beta$ hCG e incluso, en ocasiones existe la necesidad de realizar una laparoscopia para su confirmación diagnóstica. Dicho procedimiento conlleva no sólo repercusiones psicológicas adversas en la madre, sino también consecuencias a nivel reproductivo. Todas estas razones justifican la investigación de técnicas diagnósticas que permitan un diagnóstico preciso y precoz. Para ello necesitamos entender mejor los mecanismos de la placentación humana en etapas precoces y los mecanismos fisiopatológicos del EE haciendo estudios al respecto.

Nos encontramos por ello, que numerosos investigadores se han esforzado en los últimos años por encontrar otros marcadores bioquímicos para tratar de reducir la tasa de complicaciones y errores diagnósticos que suceden a menudo en el contexto de un EE (Barnhart, 2012). De momento, la progesterona es uno de los pocos empleados en la práctica clínica habitual, pero ésta sólo aporta información acerca de la viabilidad de la gestación, pero no así de su localización (Verhaegen y cols., 2012), lo cual permite espaciar los controles, pero no determinar la ubicación del saco gestacional. La proteína A plasmática asociada a la gestación (PAAP- A) y la inhibina A, al igual que la progesterona, permiten identificar la viabilidad del embarazo pero no nos proporcionan información sobre su localización (Kirk y cols., 2009; Puente, 2014). Otro marcador, la activina A, incrementa sus niveles en la circulación materna conforme progresa el



embarazo, (Condous y cols., 2006; Morse y cols., 2012) y parece tener un papel en la decidualización endometrial, por lo que una alteración en su producción podría derivar en una implantación fuera del útero (Florio y cols., 2007). De hecho en algunos casos de EE, se han detectado niveles muy bajos de esta proteína, por lo que el grupo de Florio y cols. contemplan que la determinación aislada de la activina A podría tener una potencial aplicación clínica, aunque su utilidad debe aún ser estudiada y discutida con mayor profundidad. Se ha descrito también una disminución de los niveles de ANG1 y ANG2 (angiotensina 1 y angiotensina 2) en el aborto temprano y en el EE. La ANG 1 se ha comprobado capaz de discriminar también entre EE y aborto, no así la ANG2 (Daponte y cols., 2013). Así mismo, los niveles de citoquinas como IL-8, IL-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) se han visto aumentados en los casos de gestación ectópica frente a abortos o gestaciones evolutivas (Soriano y cols., 2003). Dado que el rendimiento diagnóstico de un único marcador puede no resultar útil, se han descrito varios estudios en relación con la aplicación de varias combinaciones de éstos, con el fin de mejorar su capacidad diagnóstica, como la descrita en el estudio Mueller y cols., 2004. Estos asociaron la determinación de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), progesterona, inhibina A y activina A. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre estos marcadores de forma aislada y combinada para que lleguen a tener una aplicación en la práctica clínica diaria. Parece más alentador canalizar los esfuerzos en la detección de nuevos biomarcadores mediante el estudio directo y a gran escala de los productos codificados por el genoma, lo cual, viene facilitado por la irrupción de la genómica y la proteómica, que permiten realizar un estudio mucho más amplio y menos sesgado, proporcionando una información muy superior (Senapati y Banhardt, 2013).

Estudios proteómicos comparativos de suero o plasma de casos y controles serían una buena estrategia para la detección de marcadores distintivos. Aún así, son estudios complicados debido a la alta complejidad de la proteómica sérica, la enorme abundancia de proteínas existentes, la sustancial variabilidad interindividuo y la potencial variación durante la toma de muestras y procesamiento de las mismas. Además, la mayoría de los biomarcadores útiles a nivel clínico están presentes en concentraciones bajas, lo cual dificulta aún más su determinación.

En las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto que la regulación de una gran variedad de procesos biológicos depende en cierta medida de RNAs pequeños no codificantes, de entre los que destacan los miRNAs (Zhang y cols., 2007; Lee y Dutta, 2009). De hecho, el número de miRNAs identificados en diversas especies se ha incrementado de forma exponencial en los últimos años. Todo ello sugiere un considerable potencial funcional que no ha sido aun suficientemente clarificado.

Teniendo en cuenta que la placentación imita fenómenos de invasión y progresión tumoral

controlados por sistemas de desarrollo complejos y sometidos a cascadas de regulación donde se ha visto que juegan un papel importante los miRNAs, es razonable plantearse que también habrán miRNAs implicados en la regulación de la placentación y el embarazo de humanos y de otras especies.

Hoy en día se sabe que los miRNAs tienen una función determinante en el desarrollo embrionario precoz, hecho que ha sido demostrado en un amplio rango de especies, desde el *Caenorhabditis Elegans* hasta los mamíferos (Lee y cols., 1993; Reinhart y cols., 2000; Blakaj y Lin, 2008; Laurent, 2008; Foshay y Gallicano, 2009; Suh y Blelloch, 2011; Wang y cols., 2012). Por ejemplo, una delección en ratones del gen *Dicer 1* (*Dcr-1*) supuso una parada del desarrollo embrionario en el día 7,5 debido a defectos de diferenciación (Bernstein y cols., 2003). Yang y cols., por otro lado, publicaron efectos similares entre los días 12,5 y 14,5 de gestación debido a una alteración en la angiogénesis embrionaria, lo cual también se encuentra bajo el control regulador de miRNAs. Medeiros y cols. obtuvieron resultados similares. Estos autores observaron que cuando aparecía una deficiencia de miR-290-295 se producían defectos en las células germinales y muerte embrionaria. Rosenbluth y cols., estudiaron la expresión de 754 miRNAs en 14 blastocistos mediante array. Tras esto, cuantificaron con PCR a tiempo real los más expresados en 27 blastocistos. Concluyeron que los blastocistos humanos expresan multitud de miRNAs los cuales son esenciales para el desarrollo y supervivencia embrionaria, así como para la conservación de la pluripotencialidad celular. La mayoría de estos miRNAs ya habían sido documentados previamente en células madre humanas (Suh y cols., 2004; Tzur y cols., 2008), embriones de mamíferos (Yang y cols., 2012; Hand y cols., 2009) o en placentas de primates (Noguer-Dance y cols., 2010). Además, estos investigadores compararon la expresión de miR-518d-5p en embriones femeninos y masculinos. Obtuvieron una expresión 5,6 veces superior en embriones masculinos lo cual sugiere que existe algún grado de diferenciación sexual ya en la etapa embrionaria del blastocisto. Curiosamente este miRNA pertenece al cluster C19MC, el cluster más grande en humanos que codifica miRNAs específicos de la placenta y que probablemente estén implicados en el desarrollo placentario y la implantación (Noguer-Dance y cols., 2010; Galiano y Pellicer, 2014). También hay estudios que han encontrado una expresión más elevada en embriones de ratones que en ratones adultos lo cual apoya su función en el desarrollo embrionario (Yu y cols., 2007). Rosenbluth y cols. también demostraron en 2014 la presencia de estos miRNAs cuando se emplea la técnica de fecundación *in vitro* y además vieron diferencias de expresión en función del método de fertilización empleado, la carga cromosómica y el resultado final del embarazo, con lo que concluyen que pueden ser marcadores potenciales para la predicción del éxito de las técnicas de reproducción asistida.

Todos estos hallazgos han multiplicado el interés por la posible utilidad de la

determinación de miRNAs circulantes como marcadores de determinadas patologías, incluyendo complicaciones gestacionales de naturaleza diversa. De hecho, desde 2004 hasta la fecha, han sido publicados un número aún limitado, aunque ilustrativo, de estudios que documentan cambios en los perfiles circulantes de miRNAs tanto en tejido humano normal como en tejido humano patológico (Viswanathan y Daley, 2010; Morales-Prieto y cols., 2013; Zhao y cols., 2013). También, se han identificado algunos miRNAs circulantes específicos del embarazo (Barad 2004; Liang y cols., 2007; Prieto y Markert, 2011; Zhao y cols., 2012; Cretoiu, 2016) que tienen un obvio interés fisiopatológico y podrían representar biomarcadores alentadores para la identificación de determinadas complicaciones del mismo. Estos estudios, sin embargo, se basaron en análisis de expresión en tejido placentario a término, con escasas réplicas, sin considerar consecuentemente los presumibles cambios de expresión a lo largo de la gestación y la variabilidad individual.

Un estudio reciente ha documentado cómo la expresión de miR-16 y miR-21 en placentas a término puede tener utilidad como marcador de crecimiento fetal (Maccani y cols, 2011). Del mismo modo, se ha descrito cómo la exposición a tóxicos, tales como el tabaco, resulta en la supresión de la expresión en placenta a término de estos miRNAs, así como de miR-146 (Prieto y Markert, 2011). Este mismo grupo realizó análisis de expresión en células de coriocarcinoma que han permitido identificar miRNAs con expresión aumentada o disminuida frente a células trofoblásticas normales. También han identificado el presumible papel de miR-199b en el control inhibitorio de la proliferación del trofoblasto. Además, se han identificado diversos miRNAs que podrían estar implicados en la fisiopatología de la preeclampsia (Noack y cols., 2011; Hromadnikova y cols., 2013). Un estudio reciente plantea que posiblemente una alteración en la regulación de ciertos miRNAs provocaría una disregulación sobre sus dianas, los genes DCN, LEP, PEG10, PPARG, SOCS3 y VWF que tienen a su vez implicación en la fisiopatología de la preeclampsia (Orsolya y cols., 2015).

Sin embargo, hasta la fecha, existen pocas publicaciones sobre la expresión de miRNAs específicos en tejido embrionario en etapas tempranas de la gestación, ya sea normal o patológica. Sólo existen dos estudios en las que se compara dicha expresión en tejido trofoblástico entre el primer y el tercer trimestre del embarazo. Por un lado, la del grupo de Morales-Prieto del 2012 donde observaron una diferencia en el perfil de expresión de miRNAs en placenta humana entre el primer y tercer trimestre, estando los miRNAs del cluster C14MC infraexpresados en el tercer trimestre y los del cluster C19MC sobreexpresados. Por otro lado, Gu y cols. publicaron en 2013 un estudio donde concluyeron que los miRNAs con función oncogénica, angiogénica o antiapoptótica estaban predominantemente expresados en el primer trimestre, mientras que los miRNAs que promueven la diferenciación celular y que actúan de supresores tumorales estaban más expresados en el tercer trimestre, lo cual hace pensar que estos miRNAs tienen un papel

crítico en el desarrollo placentario. En ambos casos, el tamaño muestral fue reducido y en ninguno de ellos se compararon los resultados con controles.

Algo parecido ocurre con la existencia de estudios sobre el comportamiento de los miRNAs en gestaciones ectópicas. Sólo Zhao y cols. han defendido la utilidad potencial de emplear miR-323-3p como biomarcador de EE. Sin embargo, esta observación no se ha demostrado de forma independiente en otro estudio y además como referíamos anteriormente, sólo determinaron los niveles circulantes. Además, otros autores han refutado dichos resultados (Miura y cols., 2010). Estos últimos abogan que miR323-3p no está limitado al trofoblasto 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 ni necesariamente proceden de embarazos de localización ectópica. Sin embargo, el grupo de Miura y cols en un estudio más reciente del 2015 si apoyan a Zhao et al., ya que encontraron diferencias en la expresión entre EE y abortos, aunque esta no fue significativa. Ellos culpan al escaso tamaño muestral de no haber podido demostrar esta asociación.

El único estudio de casos y controles ha sido publicado por Domínguez y cols., los cuales constatan una expresión diferenciada y estadísticamente significativa de distintos miRNAs en tejido trofoblástico, en casos de EE frente a controles de similares edades gestacionales. Todas estas investigaciones concluyen que los resultados son aún limitados por el escaso tamaño muestral y que precisan estudios con mayor potencia para confirmar su valía para el diagnóstico precoz del embarazo ectópico. Es por ello que estudios adicionales de expresión tisular de miRNAs seleccionados, especialmente en etapas tempranas de la gestación y en situaciones patológicas como el EE, permitirían definir de modo preciso los perfiles específicos de expresión de familias miRNAs en tejido embrionario durante el periodo inicial de la placentación. Esto nos proporcionaría un mejor conocimiento del posible papel fisiológico de los mismos, y nos permitiría establecer una correlación exhaustiva entre expresión placentaria y niveles circulantes, con la consecuente validación de biomarcadores, tanto de gestación normal como de posibles patologías placentarias.

En este trabajo evaluamos el patrón de expresión de LIN28B, Let-7a y otros miRNAs relacionados en tejido embrionario, en etapas precoces de gestaciones normales y de embarazos ectópicos (entre 5-9 semanas de amenorrea). Cabe destacar, que la expresión de LIN28 y los miembros de la familia Let-7 habían sido ya estudiados en placentas de rata y de humanos (Chan y cols., 2013), pero lo que podemos deducir de estos trabajos es que se estudió solo el tejido placentario en gestaciones a término, por lo que no proporcionan ninguna información de lo que sucede con estos miRNAs en fases precoces del embarazo.

En nuestro estudio analizamos por tanto tejido embrionario de embarazos ectópicos y lo comparamos con controles (tejido embrionario de embarazos normales, no patológicos) de las mismas edades gestacionales, los cuales fueron obtenidos de pacientes que se sometían a interrupciones voluntarias del embarazo. La importancia de seleccionar como controles embarazos viables sin patología teórica y no emplear por ejemplo material trofoblástico de abortos diferidos radica en eliminar la presencia de cualquier factor de confusión externo como alteraciones cromosómicas, trombofilias o exposición a tóxicos que pueden ser la causa de un aborto natural y que podrían hacer cambiar los miRNAs y rutas estudiadas en este estudio.

Nuestros análisis del tejido embrionario normal revelaron que los niveles de LIN28B eran casi nulos en gestaciones por debajo de las 6 semanas, en tanto que Let-7a, miR-132 y miR-145 alcanzaban sus cifras máximas en estas etapas del embarazo. La transición de la semana 6 a la semana 7 marca un cambio drástico y recíproco en dichos marcadores, obteniendo un agudo incremento de los niveles de LIN28 y un marcado descenso de Let-7a, y algo menor de miR-132 y miR-145. El comportamiento opuesto obtenido de la expresión al pasar a la semana 7 de embarazo apoya que la disrupción que ocurre en el EE sobreviene claramente durante el proceso de implantación, como ha sido descrito por numerosos estudios (Pisarka, MD y cols., 1998; Molinaro, TA y cols., 2007; Farquhar, CM, 2005; Domínguez, F y cols., 2013). Pues la implantación comienza en la cavidad uterina con la aposición y adhesión del blastocisto en torno al séptimo día tras la fecundación (tercera semana) gracias a la expresión por el blastocisto de moléculas de aposición y adhesión, como integrinas, laminina, fibronectina y MUC-I y también a la influencia de las citocinas locales y las derivadas del blastocisto (factor de crecimiento epidérmico unido a heparina, factor inhibidor de leucemia e IL-11) (Giudice 1999; Thathiah y cols., 2004). Cuando se completa este paso, empieza la invasión y el trofoblasto penetra el epitelio uterino. En el día 12, después de la fertilización (semana 4) el blastocisto se encuentra completamente incluido en el estroma subepitelial, y el epitelio uterino crece para cubrir el sitio de implantación (Benirschke y Kaufmann, 1999).

La expresión de miRNAs en fases precoces del embarazo permanece aún desconocida, aunque nuestros resultados sugieren que tienen un papel importante en este proceso biológico, al igual que en otros muchos. Seguramente los perfiles opuestos que suceden en el sistema LIN28B/Let-7a al comparar embarazos normales y EE y los cambios drásticos a partir de la sexta semana en adelante estén reflejando la expresión que ocurre en la implantación ya sea en gestaciones normales o en el EE. Aunque la implantación finaliza a la cuarta semana y el cambio significativo en la expresión de LIN28B/Let-7a ocurre al sobrepasar la semana 6 de gestación, podría ser que estos marcadores permanezcan con valores similares desde la implantación para luego descender o ascender. Este punto de inflexión podría ser tomado como referencia para

establecer el momento de la amenorrea en el que podría tener un interés en la aplicación clínica. Si bien, se necesitarían hacer estudios con un mayor tamaño muestral para poder analizar su expresión por subgrupos dentro de las gestaciones menores de 6 semanas y así dilucidar si son cambios que coinciden exactamente en el tiempo con el proceso de implantación normal comparada con la anómala. La limitación es que resulta complicado obtener muestras de EE de menor tiempo porque el momento en el que se conoce la gestación suele ser a partir del retraso menstrual de al menos unos días y hasta que se establece el diagnóstico de EE o bien se lleva a cabo una interrupción voluntaria pasan esas semanas que se escapan al estudio (gestaciones menores de 5 semanas).

Los cambios en la expresión de LIN28 y Let-7 también se han relacionado con invasión tumoral y carcinogénesis. Así, se ha visto una clara sobreexpresión de LIN28 en diversos tumores incluidos cánceres hematológicos (Zhou y cols., 2013), lo cual sugiere un papel promotor de invasión de esta molécula. Con los miembros de la familia Let-7 sucede justamente lo contrario, ya que se ha reportado que tienen un papel como supresor de tumores mediante la inhibición de oncogenes y como reguladores de varias cascadas de mitogénesis, como Myc, Hmga2, Ras, JAK y STAT3. La activación de LIN28 provocaría una supresión de la familia Let-7 lo cual derivaría en una activación de la oncogénesis. Todo ello hace especular que un incremento del ratio LIN28B/Let-7, como el que observamos en la transición de la semana 6 a la 7 de embarazo, podría estar asociado a un fenotipo pro-proliferativo y de invasión. Resulta tentador pensar que este cambio juega un papel en la invasión trofoblástica y la formación de la placenta durante etapas precoces del embarazo, aunque todavía no conocemos dicho mecanismo. El papel regulador de miR-132 y miR-145 también merecen estudios más exhaustivos. Estos miRNAs también descienden a partir de la semana 7 significativamente y parece ser que participan en la regulación de la síntesis de LIN28B (Sangiao-Alvarellos y cols., 2013).

Al estudiar el tejido embrionario normal y compararlo con el del EE en estas etapas precoces esperábamos encontrar diferencias en la expresión derivadas de la implantación anómala que sucede en el EE. De hecho, se asume que en el embarazo ectópico la fecundación del óvulo se produce correctamente y es durante la migración del óvulo ya fecundado donde aparece alguna circunstancia, que se traduce en una implantación prematura antes de alcanzar la cavidad uterina (Shaw y cols., 2010; Brown y Horne, 2011). En línea con esta idea, observamos que en los casos de EE donde la implantación sucedía en un lugar inapropiado (que en nuestro estudio fue siempre la trompa) los perfiles de expresión fueron opuestos a los de las gestaciones control. Los niveles de LIN28B en tejido embrionario de EE fueron anormalmente altos en gestaciones  $\leq 6$  semanas y persistieron elevados aunque no tanto en semanas posteriores (7-9 semanas). Por el contrario, la expresión de Let-7a se encontró ya suprimida en muestras de EE  $\leq 6$  semanas, suceso que se

anticipó a lo que había sucedido en gestaciones normales, donde estos niveles tan bajos se detectaron a partir de la semana 7. Estos perfiles de expresión implican un incremento del ratio LIN28/Let-7 en el tejido placentario de EE en embarazos  $\leq 6$  semanas. Suponiendo que esta relación pudiera favorecer un fenotipo pro-proliferativo e invasivo, es defendible que tal perturbación en el sistema LIN28/Let-7 podría contribuir a la alteración del proceso de invasión trofoblástica que caracteriza al EE, si bien es cierto que nuestros análisis se limitaron al tejido embrionario temprano y no nos permitieron conocer la fuente celular específica responsable de la expresión de las dianas LIN28B y Let-7a.

Con todo, los cambios recíprocos reportados entre LIN28B y Let-7a tanto durante el embarazo normal temprano como en placentas de EE, sugieren que estos dos factores podrían regularse de forma paracrina, resaltando aún más la relevancia funcional de esta regulación recíproca. De hecho, la función más reconocida de LIN28B es la inhibición de la maduración de la familia Let-7, probablemente mediante la unión a asas terminales de los precursores de esta familia de miRNAs (Viswanathan y Daley, 2010). A su vez, Let-7a es capaz de inhibir la expresión de LIN28B uniéndose al extremo 3' UTR del gen LIN28B, generando un doble feedback negativo (Heoy cols., 2009).

Como apuntábamos anteriormente, miR-323-3p es el único biomarcador relacionado con EE que ha sido reportado hasta la fecha (Zhao y cols., 2012). Sin embargo, este estudio se limitó a la determinación de este miRNA en plasma y no aporta ninguna información sobre su patrón de expresión en tejido embrionario. Nuestros análisis comparativos revelaron que, a diferencia de con Let-7a, miR-132 y miR-145, la expresión embrionaria de miR-323-3p fue aumentando a lo largo del embarazo temprano, siendo los niveles mínimos detectados en tejido embrionario por debajo de las 6 semanas para posteriormente comenzar un ascenso en su expresión. Inesperadamente, a pesar del aumento reportado sobre los niveles circulantes de miR-323-3p en el EE, nuestros datos mostraron que la expresión en tejido embrionario ectópico fue menor desde la semana 7 en adelante, de modo que el aumento en la expresión de miR-323-3p observado en las gestaciones normales no se detecta en los embarazos ectópicos. En consecuencia, aunque miR-323-3p ha sido propuesto como un miRNA específico de embarazo (Miura y cols., 2010), nuestros resultados ponen en duda el origen placentario del exceso de este factor en los EE. De hecho, la posibilidad de que la fuente de miR-323-3p circulante en los casos de EE pueda no ser únicamente el tejido embrionario ya ha sido sugerida (Zhao y cols., 2012; Miura y cols., 2010). Nuestros resultados apoyan, de hecho, el origen no embrionario de este miRNA y llaman a la necesidad de confirmar la utilidad del uso independiente de los niveles plasmáticos de miR-323-3p como marcador universal de gestación ectópica.

Nuestro estudio es el primero en documentar los perfiles de expresión de los elementos del sistema LIN28/Let-7, así como de otros miRNAs relacionados, en tejido embrionario durante las primeras etapas de gestación normal y embarazo ectópico. Nuestros datos revelan los patrones de expresión opuestos de LIN28B y Let-7a en tejido embrionario durante el embarazo precoz, observando un incremento del ratio LIN28B/Let-7a desde las fases más precoces estudiadas ( $\leq 6$  semanas) en el caso de los EE, mientras que en gestaciones normales este incremento del ratio se hace esperar hasta la transición de la sexta a la séptima semana de embarazo. Dado el papel propuesto de la familia LIN28 y let-7 en el control de la proliferación celular y la invasión tumoral, resulta tentador sugerir que los cambios en la expresión de LIN28B y Let-7a señalados anteriormente podrían desempeñar un papel en el control de la placentación normal y ectópica.



# 07

---

## CONCLUSIONES

---

## 7. CONCLUSIONES

---

1. Existe un drástico aumento de los niveles de expresión de LIN28B en tejido embrionario de gestaciones humanas normales en embarazos con edades gestacionales por encima de las 7 semanas. La expresión de LIN28B en tejido embrionario de gestaciones menores o iguales a 6 semanas es significativamente superior en embarazos ectópicos que en embarazos normales.
2. La expresión de Let-7a fue máxima en tejido embrionario de gestaciones humanas normales menores de 6 semanas para a partir de la semana 7 experimentar un descenso drástico. La expresión de Let-7a en tejido embrionario de gestaciones menores o iguales a 6 semanas fue significativamente inferior en embarazos ectópicos que en embarazos normales.
3. La expresión de mir-132 y mir-145 fue máxima en tejido embrionario de gestaciones humanas normales menores de 6 semanas para a partir de la semana 7 experimentar un descenso en este caso más gradual que el que se observó para Let-7a. Antes de la 6ª semana, la expresión de mir-145 tendió a ser más elevada en tejido embrionario de gestaciones ectópicos que en gestaciones normales, mientras que para miR-132 se observó la tendencia contraria.
4. En gestaciones normales, los niveles de expresión de mir-323-3p se incrementaron significativamente entre las 6 y las 7-9 semanas de gestación. En este periodo (semanas 7 y 9 de embarazo), la expresión de mir-323-3p en tejido embrionario de embarazos ectópicos fue significativamente inferior a la del embarazo normal.
5. En gestaciones normales, la transición entre las 6 y las 7 semanas de edad gestacional marca un cambio drástico y recíproco en los marcadores estudiados.

6. Como conclusión final, observamos que en el tejido embrionario de los embarazos ectópicos existe un incremento del ratio LIN28B/Let-7a desde antes de las 6 semanas, mientras que en gestaciones normales este incremento del ratio se hace esperar hasta la séptima semana de embarazo. Dado el fenotipo pro-proliferativo y de invasión que se asignado al incremento del ratio LIN28B/Let-7 en determinados tejidos, esta diferencia observada entre los casos y los controles podría explicar un papel en la placentación normal versus ectópica.

# 08

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

Alsuleiman SA, Grimes EM. Ectopic pregnancy: a review of 147 cases. *J Reprod Med* 1982; 27:101.

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;20:308–17.

Altunaga Palacio M, Rodríguez Morales Y, Lugones Botell M. Manejo del embarazo ectópico. *Rev Cubana Obstet Ginecol* [Internet]. 2011 [citado 12 ene 2013];37(4):513-23. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2011000400008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2011000400008&lng=es).

Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reprod Biomed Online* 2007 dic [citado 12 ene 2013]; 1: 49-55.

Ault KA, Faro S. Pelvis Inflammatory Disease. Current diagnostic criteria and treatment guidelines. *Postgrad Med*. 2003;93(2):85-6,89-91.

Backman T, Rauramo I, Huhtala S, Koskenvuo M. Pregnancy during the use of levonorgestrel intrauterine system. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:50.

Barad O. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 2004; 14: 2486-94.

Balzer E, Moss EG. Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biol*. 2007;4:16–25.

Barnhart KT, Simhan H, Kamelle SA. Diagnostic accuracy of ultrasound above and below the beta-hCG discriminatory zone. *Obstet Gynecol* 1999; 94:583.

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: 778-784.

Barnhart KT, Hummel AC, Sammel MD, Menon S, Jain JK, Chakhtoura NA. Use of “2-dose” regimen of methotrexate to treat ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2007;87:250-6.

Barnhart KT. Ectopic pregnancy. *N Engl J Med* 2009;361:379-87.

Barnhart KT. Early pregnancy failure: beware of pitfalls of modern management. *Fertil Steril* 2012; 98:1061-5.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.

Benirschke K, Kaufmann P. Early development of the human placenta. In: Benirschke K, Kaufmann P, eds. *Pathology of the human placenta*. 1st ed. New York: Springer-Verlag, 1991; pp:13-21.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;35:215–7.

Blakaj A, Lin H. Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs. *J Biol Chem* 2008;283:9505–8.

Blohm F, Friden B, Milsom I. A prospective longitudinal population-based study of clinical miscarriage in an urban Swedish population. *BJOG* 2008; 115: 176-183.

Bouyer J, Coste J, Shojael T et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population based study in France. *Am J Epidemiol.*2003; 157: 185-194.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: F19–36.

Brown JK y Horne AW. Laboratory models for studying ectopic pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011;23:221-226.

Buckley RG, King KJ, Disney JD, et al. History and physical examination to estimate the risk of ectopic pregnancy: validation of a clinical prediction model. *Ann Emerg Med* 1999; 34:589.

Bueno MJ, de Castro IP, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle.* 2008;7(20):3143-8.

Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. Let-7 microRNAs in development, stemcells and cancer. *Trends Mol Med* 2008; 14: 400–9.

Buster JE, Krotz S. Reproductive performance after ectopic pregnancy. *Semin Reprod Med* 2007; 25 (2): 131.

Bustin,S.A. 2005a. Real-Time PCR. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker.New York, p. 1131-1135.

Cartwright J, Duncan WC, Critchley HOD, Horne AW. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reproduction* (Cambridge, England). 2009;138:9–22.

Chan HW, Lappas M, Yi Yee SW, Vaswani K, Mitchell MD, Rice GE .The expression of the let-7 miRNAs and Lin28 signalling pathway in human term gestational tissues. *Placenta* 2013; 34:443–8.

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.

Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK,et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008; 54: 482-90.

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; 1:255.

Cole LA. Individual deviations in human chorionic gonadotropin concentrations during

pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204:349.e1.

Condous G, Kirk E, Lu C, et al. Diagnostic accuracy of varying discriminatory zones for the prediction of ectopic pregnancy in women with a pregnancy of unknown location. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 26:770.

Condous G, Okaro E, Khalid A, Lu C, Van Huffel S, Timmerman D et al. A prospective evaluation of a single-visit strategy to manage pregnancies of unknown location. *Hum Reprod* 2005;20:1398-403.

Condous G, Kirk E, Van Calster B, Van Huffel S, Timmerman D, Bourne T. Failing pregnancies of unknown location: a prospective evaluation of the human chorionic gonadotrophin ratio. *BJOG* 2006; 113:521-527.

Creanga AA, Shapiro-Mendoza CK, Bish CL, et al. Trends in ectopic pregnancy mortality in the United States: 1980-2007. *Obstet Gynecol* 2011; 117:837.

Croxatto HB OM, Diaz S, Hess R, et al. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;132:629-34.

Cunningham Gary F, Gant NT, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Embarazo Ectópico. En: *Williams Obstetricia*. 21ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2005. p. 757-6.

D'Antonio F, Rijo C, Thilaganathan B, Akolekar R, Khalil A, Papageorgiou A, Bhide A. Association between first-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and obstetric complications. *Penat Diagn* 2013;33(9):839-47.

Daya S. Human chorionic gonadotropin increase in normal early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:286.

Daponte A, deligeoroglou E, Pournaras S, Tsezou A, Garas A, Anastasiadou F, Hadjichristodoulou C, Messinis IE. Angiotensin-1 and angiotensin-2 as serum biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion: a case-control study. *Clin Chim Acta* 2013;415:145-51.

Dart RG, Kaplan B, Varaklis K. Predictive value of history and physical examination in patients with suspected ectopic pregnancy. *Ann Emerg Med* 1999; 33:283.

Dart R, Ramanujam P, Dart L. Progesterone as a predictor of ectopic pregnancy when the ultrasound is indeterminate. *Am J Emerg Med* 2002;20:575-9.

Deutchman M, Tubay AT, Turok D. First trimester bleeding. *Am Fam Physician* 2009; 79(11): 985-994.

Domínguez F, Remohí J, Pellicer A, Simon C. Human endometrial receptivity: a genomic approach. *Reprod Biomed Online* 2003;6:332-8.

Domínguez F, Moreno-Moya JM, Lozoya T, Romero A, Martínez S, Monterde M, Gurrea M, Ferri B, Núñez MJ, Simón C, Pellicer A. Differential miRNA profiles of trophoblast tissue and serum samples obtained in ectopic pregnancies. *PLoS One*. 2014; 31;9(1):e87698.

Domínguez F, Yanez-MO M, Sanchez-Madrid F y Simon C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J* 2005; 19: 1056-1060.

Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, Morelli AE, Sadovsky Y. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol Hum Reprod* 2012; 18:417–424.

Dorak, M.T.2008. Real-Time PCR. Disponible en: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>.

Cretoiu D, Xu J, Xiao J, Suci N and Cretoiu SM. Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Disease Markers* 2016.

Elito JJ, Montenegro NA, Mota DM, Soares RC , Camano L. Unruptured ectopic pregnancy: diagnosis and treatment. *Rev Bras Ginecol Obstet.* [serial on the Internet] 2008 Mar [cited 2009 June 19];30(3): 149-159. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032008000300008&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032008000300008&lng=en). doi: 10.1590/S0100-72032008\_000300008.

Enders AC. Contributions of comparative studies to understanding mechanism of implantation. *En: Endocrinology of embryo-endometrium interactions.* 1994; 9: 11-16.

Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, et al. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 2008;7(6):759-64.

Farquhar CM. Ectopic pregnancy. *Lancet* 2005;366:583-591.

Fernández H, Lelaidier C, Thouvenez V, Frydman R. The use of therapeutic predictive score to determine inclusion criteria for the non surgical treatment of ectopic pregnancy. *Human Reprod.* 1991;6:995-8.

Florio P, Severi FM, Cobellis L, Danero S, Bome A, Luisi S, Petraglia F. Serum activin A and inhibin A. New clinical markers for hydatidiform mole. *Cancer* 2002; 94:2618–2622

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;92:1748-53.

Foshay KM, Gallicano GI. MiR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol* 2009;326:431–43.

Furlong LA. Ectopic pregnancy risk when contraception fails. A review. *J Reprod Med* 2002; 47:881.

Galán A, O'connor JE, Valbuena D, Herrer R, Remohí J, Pampfer S, Pellicer A, Simón C. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesión. *Biol Reprod* 2000; 63: 430-439.

Galiano D y 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; 143:761.



- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3(9):e3148.
- Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999;14:3-16.
- Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simón C. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial Leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4883-4888.
- Goldberg JM, Falcone T. Effect of diethylstilbestrol on reproductive function. *Fertil Steril* 1999; 72:1.
- Croxatto HB. Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod Biomed Online*. 2002;4:160-9.
- Gracia CR, Barnhart KT. Diagnosing ectopic pregnancy: decision analysis comparing six strategies. *Obstet Gynecol* 2001; 97(3): 464-470.
- Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;304:836–843
- Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, et al. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene*. 2006; 384: 51–61.
- 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.
- Hajenius PJ, Mol F, Mol BW, et al. Interventions for tubal ectopic pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD000324.
- Hand NJ, Master ZR, Eauclaire SF, Weinblatt DE, Matthews RP, Friedman JR. The microRNA-30 family is required for vertebrate hepatobiliary development. *Gastroenterology* 2009;136:1081–90.
- He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*. 2009;137:901–911.
- Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, et al. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell*. 2008; 32: 276-84.
- Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, et al. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 2009;138:696-708.
- Hillis SD, Owens LM, Marchbanks PA, et al. Recurrent chlamydial infections increase the risks of hospitalization for ectopic pregnancy and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:103.
- Horcajadas JA, Riesewijk A, Domínguez F, Cervero A, Pellicer A, Simón C. Determinants of endometrial receptivity. *Ann NY Acad Sci* 2004;1034: 166–75.
- Horne AW, Duncan WC, Critchley HO. The need for serum biomarker development for diagnosing and excluding tubal ectopic pregnancy. *Acta Obstet Gyn* 2010;89:299-301.
- Horne AW, McBriede R, Denison FC. Normally rising hCG does not predict live birth in women

presenting with pain and bleeding in early pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 156: 120-121.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, Kestlerova A, Novotna V, et al. Circulating C19MC microRNAs in preeclampsia, gestational hypertension, and fetal growth restriction. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:186041.

Hu SJ, Ren G, Liu JL, Zhao ZA, Yu YS, Su RW, et al. MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem* 2008;283:23473–84.

Job-Spira N, Fernandez H, Bouyer J, et al. Ruptured tubal ectopic pregnancy: risk factors and reproductive outcome: results of a population-based study in France. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:938.

Jordan SD. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 434-46.

Kamwendo F, Forslin L, Bodin L, Danielsson D. Epidemiology of ectopic pregnancy during a 28 year period and the role of pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect* 2000;76:28-3.

Kirchler HC, Seebacher S, Alge AA, et al. Early diagnosis of tubal pregnancy: changes in tubal blood flow evaluated by endovaginal color Doppler sonography. *Obstet Gynecol* 1993; 82:561.

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;24:2451-6.

Kirk E, Papageorgiou AT, Condous G, Tan L, Bora S, Bourne T. The diagnostic effectiveness of an initial transvaginal scan in detecting ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2007; 22(11): 2824-2828.

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: 185-91.

Kriebs JM, Fahey JO. Ectopic pregnancy. *J Midwifery Womens Health* 2006; 51(6): 431-439.

Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 2010;82:791–801.

Larraín D, Marengo F, Bourdel N, et al. Proximal ectopic pregnancy: a descriptive general population-based study and results of different management options in 86 cases. *Fertil Steril* 2011; 95:867.

Laurent LC. MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development. *J Cell Mol Med* 2008;12:2181–8.

Lee DR, Feinbaum R, Ambros V. The *C. Elegans* heterochromic gene *lin-4* encodes smallRNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*.1993;75:843-854.liangluo

Lee DR LJ, Yoon HS, Lee HJ, et al. The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. *Hum Reprod*. 1997;12:2493-8.

Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 199-227.

- Lessey BA, Castelbaum A, Buck CA. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994; 62: 497-506.
- Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007; 8: 166.
- Livak KJ y Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Lipscomb G. Diagnosis and monitoring of ectopic and abnormal pregnancies. Gronowski A, ed. *Handbook of clinical laboratory testing during pregnancy*. Totowa, NJ:Humana Press; 2004;159-66.
- 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.
- Maccani MA, Padbury JF, Marsit CJ. MiR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS One* 2011;6(6):e21210.
- Marion LL, Meeks GR. Ectopic pregnancy: history, incidence, epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55:376-86.
- Mark A y Rock JA. Capítulo 22: Embarazo ectópico. In: Rock JA, Jones HW. *Te-Linde: Ginecología quirúrgica (TI)*. 9ª ed. Panamericana; 2006. p 553-84.
- Martín J, Domínguez F, Avila S, Castrillo JL, Remohí J, Pellicer A, et al. Human endometrial receptivity: gene regulation. *J Reprod Immunol* 2002;55:131-9.
- Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci* 2011;18: 46-56.
- McBain JC, Evans JH, Pepperell RJ, et al. An unexpectedly high rate of ectopic pregnancy following the induction of ovulation with human pituitary and chorionic gonadotrophin. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87:5.
- McMalman CD, Furth EE, Omigbodun A. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: a role for cadherin-11 in trophoblast endometrium interactions? *Developmental Dynamics* 1996; 206: 201-211.
- Medeiros LA, Dennis LM, Gill ME, Houbaviy H, Markoulaki S, Fu D, et al. Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:14163-8.
- 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;20:181-5.
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K-i, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2010;56:1767-71.
- Molinaro TA, Barnhart KT. Ectopic pregnancies in unusual locations. *Semin Reprod Med* 2007; 25(2): 123-130.
- Morse CB, Sammel MD, Shaunik A, Allen-Taylor L, Oberfoell NL, Takacs P, Chung K, Barnhart

- KT. Performance of human chorionic gonadotrophin curves in women at risk for ectopic pregnancy: exceptions to the rules. *Fertil Steril* 2012Jan; 97(1):101-6.
- Mol F, Mol BW, Ankum WM, van der Veen F, Hajenius PJ. Current evidence on surgery, systemic methotrexate and expectant management in the treatment of tubal ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2008;14:309-19.
- Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, et al. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 2012;33(9):725-34.
- Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. Elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*. 1997;88:637–646.
- Moss EG, Tang L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol*.2003; 258: 432–42.
- Mueller MD, RAio L, Spoerri S, et al. Novel placental and nonplacental serum markers in ectopic versus normal intrauterine pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81:1106-1111.
- Munro KI, Horne AW, Duncan WC, Critchley HOD. Features associated with time to diagnosis and management of ectopic pregnancy. *Scot Med J* 2008;53:49.
- Murphy, V.E., Smith, R., Giles, W.B. & Clifton, V.L. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* 27, 141-69 (2006).
- Murray H, Baakdah H, Bardell T, Tulandi T. Diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *CMAJ* 2005; 173:905.
- Noack F, Ribbat-Idel J, Thorns C, Chiriac A, Axt-Fliedner R et al. miRNA expression profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded placental tissue samples from pregnancies with severe preeclampsia. *J Perinat Med*. 2011;39(3):267-71.
- Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 2010;19:3566–82.
- Orsolya Biró, Bálint Nagy, János Rigó Jr. Connection between placenta specific miRNA clusters and preeclampsia: a hypothetical miRNA–mRNA interaction network. *Pregnancy Hypertension* 2015;5(3):244–245.
- O’Sullivan CM UJ, Singh K, Liu S, et al. Uterine secretion of ISP1 & 2 tryptases is regulated by progesterone and estrogen during pregnancy and the endometrial cycle. *Mol Reprod Dev*. 2004;69:252-9.
- Ovejero V.J., Bermúdez M.V., Pérez Á. y García J. Hemoperitoneo masivo asociado a embarazo ectópico: revisión de su manejo diagnóstico y tratamiento quirúrgico. *Semergen*. 2011. doi:10.1016/j.semereg.2011.05.001
- Perona RM WP. Mouse blastocysts hatch invitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. *Dev Biol*. 1986;114(42-52).

- Peterson HB, Xia Z, Hughes JM, et al. The risk of ectopic pregnancy after tubal sterilization. U.S. Collaborative Review of Sterilization Working Group. *N Engl J Med* 1997; 336:762.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos TransRSoc LondBBiol Sci.* 2010; 365:1663–1678.
- Pisarka MD, Carson SA, Buster JE. Ectopic pregnancy. *Lancet* 1998; 351: 1115-1120.
- Polesskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, Duquet A, Moss EG, Harel-Bellan A. Lin-28 binds IGF-2mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev.* 2007;21:1125–1138.
- Prieto DM, Markert UR. MicroRNAs in pregnancy. *J Reprod Immunol* 2011;88(2):106-11.
- Puente JM. Marcadores de gestación no intrauterina. In: García-Velasco JA, editor. Cuadernos de medicina reproductiva: Biomarcadores. Vol 20. Num1. Madris: ANARR. Nuevo Siglos S.L; 2014. p.99-107.
- Qavi AJ, Kindt JT, Bailey RC. Sizing up the future of microRNA analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2010;398(6):2535-49.
- Qi, Y., Wang, J., Wang, Y., Ai, Z., Teng, Y. Peritoneal relative to venous serum biomarker concentrations for diagnosis of ectopic pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2012;285(6):1611-7.
- Qiu C, Ma Y, Wang J, Peng S, Huang Y. Lin28-mediated posttranscriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:1240–1248.
- Rana P, Kazmi I, Singh R. Ectopic pregnancy: a review. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Oct; 288 (4): 747-57
- Reid G, Kirschner MB, Van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 80: 193-208.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 2000;403:901–6.
- Reis FM, D'Antona D, Petraglia F. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy. *Endocr Rev* 2002; 23:230–257.
- Rivera RM, Bennett LB. Epigenetics in humans: an overview. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 7:493-9.
- Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AE, Devor E, Christenson L, Van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril* 2013;99:855–61.
- Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AET, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril.* 2014;101(5):1493-500.
- Rotas MA, Haberman S, Levgur M. Cesarean scar ectopic pregnancies: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol* 2006; 107:1373.
- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Green top Guideline No.25. The management of early pregnancy loss. London: RCOG Press; 2006.

Sandrim VC, Eleuterio N, Pilan E, Tanus-Santos JE, Fernandes K, and Cavalli R. Plasma levels of increased miR-195-5p correlates with the sFLT-1 levels in preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*. 2016; 35:150–158.

Sangiao S, Manfredi M, Ruiz F, Navarro VM, Sánchez MA y cols. Changes in Hypothalamic Expression of the Lin28/let-7 System and Related MicroRNAs During Postnatal Maturation and After Experimental Manipulations of Puberty. *Endocrinology*. 2013;154(2):942–55.

Sawada H YK, Hoshi M. Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture media and its enzymatic properties. *J Exp Zool*. 1990;254:83-87.

Seeber BE, Barhart KT. Suspected Ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006;107:399.

Seifer DB, Gutman JN, Grant WD, Kamps CA, DeCherney AH. Comparison of persistent ectopic pregnancy after laparoscopic salpingostomy versus salpingectomy at laparotomy for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1993;81:378-82.

Senapati S, Banhardt KT. Biomarkers of ectopic pregnancy and pregnancies of unknown location. *Fertil Steril* 2013;99:1107-1116.

Seror V, Gelfucci F, Gerbaud L, Pouly JL, Fernandez H, Job-Spira N et al. Care pathways for ectopic pregnancy: a population-based cost-effectiveness analysis. *Fertil Steril* 2007; 87(4): 737-748.

Shaw JL, Dey SK, Critchley HO and Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010;16:432-444.

Simón C, Piquette GN, Frances A, Danasouri I, Irwin JC, Polan ML. The effect of interleukin-1 beta on the regulation of IL-1 receptor type I messenger ribonucleic acid and protein levels in cultured human endometrial stromal and glandular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 675-82.

Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum Reprod*. 1998; 3: 219-32.

Simón C, Valbuena D. Embryonic implantation. *Ann Endocrinol*. 1999; 60: 134-6.

Simón C, Landeras J, Zuzuarregui J, Martín JC, Remohí J, Pellicer A. Early embryonic losses after oocyte donation. *Fertil Steril* 1999; 72: 1061-1065.

Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J*. 2008 Oct;275(20):4929-44.

Soriano D, Hugol D, Quang NT, et al. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2003;79:975-980.

Stovall TG, Ling FW, Buster JE. Outpatient chemotherapy of unruptured ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 1989;51:435-8.

Straszewski-Chavez, S.L., Abrahams, V.M. & Mor, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev* 2005; 26: 877-97.

Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, et al. Human embryonic stem cells express

- a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 2004;270:488–98.
- Suh N, Blelloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development* 2011;138:1653–61.
- Tay JI, Moore J, Walker JJ. Ectopic pregnancy. *BMJ* 2000;320:916-9.
- Tong MH, Mitchell DA, McGowan SD, Evanoff R, Griswold MD. Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod.* 2012;86:72.
- Thathiah A, Carson DD. MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J* 2004;382:363-73.
- Tulandi T, Al-Jaroudi D. Interstitial pregnancy: results generated from the Society of Reproductive Surgeons Registry. *Obstet Gynecol* 2004; 103(1): 47-50.
- Tulandi T. Clinical manifestations, diagnosis, and management of ectopic pregnancy. UpToDate, 2013[En línea]. Disponible en: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Tzur G, Levy A, Meiri E, Barad O, Spector Y, Bentwich Z, et al. MicroRNA expression patterns and function in endodermal differentiation of human embryonic stem cells. *PloS One* 2008;3:e3726.
- VanMello N, Mol F, Opmeer BC, Ankum WM, Barnhart K, Coomarasamy A, et al. Diagnostic value of serum hCG on the outcome of pregnancy if unknown location: a systematic review and meta-analysis- *Hum Reprod Update* 2012; 18:603-617.
- Vargas, DC. Obstetricia integral siglo XXI [En línea]. Universidad nacional de Colombia, 2010. [Consulta el 6 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2795/4/9789584476180.02.pdf>
- Verhaegen J, Gallos ID, van Mello NM, Abdel- Aziz M, Takwoingi Y, Harb H, Deeks JJ, Mol BW, Coomarasamy A. Accuracy of single progesterone test to predict early outcome in women with pain or bleeding: meta-analysis of cohort studies. *BMJ* 2012; 345: e6077.
- Vigano P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I. Maternalconceptus cross talk-a review. *Placenta* 2003;24:S56-61.
- Viswanathan, SR, Daley, GQ, Gregory, RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*, 2008; 320:97-100.
- Viswanathan SR, Daley GQ. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell* 2010;140: 445–9.
- Wang R, Hu Y, Song G, Hao CJ, Cui Y, Xia HF, et al. MiR-206 regulates neural cells proliferation and apoptosis via Otx2. *Cell Physiol Biochem*2012;29:381–90.
- Wu Q, Song R, Ortogero N, et al. The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287:25173–25190.
- Xu B, Huang Y. Histone H2a mRNA interacts with Lin28 and contains a Lin28-dependent posttranscriptional regulatory element. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:4256–4263.

- Xu B, Zhang K, Huang Y. Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA*. 2009;15:357–361.
- Xu P, Zhao Y, Liu M, et al. Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension*. 2014;63:1276–1284.
- Yan N, Lu Y, Sun H, et al. Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26:179–186.
- Yang DH, Moss EG. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns*, 2003; 3:719–26.
- Yang Y, Kai G, Pu XD, Qing K, Guo XR, Zhou XY. Expression profile of micro-RNAs in fetal lung development of Sprague-Dawley rats. *Int J Mol Med* 2012;29:393–402.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917–1920.
- Yu Z, Jian Z, Shen SH, Purisima E, Wang E. Global analysis of micro-RNA target gene expression reveals that miRNA targets are lower expressed in mature mouse and *Drosophila* tissues than in the embryos. *Nucleic Acids Res* 2007;35:152–64.
- Yu Z. Non-coding RNAs in gene regulation. In *Epigenetics*, ed. J. Tost, 2008:71-186.
- Zhang B, Pan X, Cobb G.P, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors X. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12.
- Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2011;6(8):e23925.
- Zhao Z, Moley KH, Gronowski AM. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem* 2013;46: 953–60.
- Zhao Z, Zhao Q, Warrick J, Lockwood CM, Woodworth A, Moley KH and Gronowski AM. Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem* 2012;58:896-905.
- Zhou J, Ng SB, Chng WJ. LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:973–8.
- Zhu H. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 2011; 147: 81-94.



# 09

---

## ANEXOS

## **ANEXO I: INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **INFORMACION CLINICA A LA PACIENTE**

“Descripción y comparación del perfil de expresión del sistema LIN28/Let- 7 y micrnas asociados en tejido placentario sano y tejido placentario procedente de embarazo ectópico”

Iniciales de la paciente: \_\_\_\_\_

Nº de paciente: \_\_\_\_\_

#### Nombre del Investigador Principal:

Olivia Vega Oomen

Servicio de Ginecología y Obstetricia.

Hospital Universitario y Politécnico La Fe

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

### **METODOLOGÍA: DESCRIPCIÓN Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO**

Se le ha propuesto que participe en un estudio piloto para la determinación de microRNAs y proteínas en las placentas y suero materno 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 y proteínas) a lo largo del embarazo en tejido embrionario 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 cuando este considere que cumple los criterios ya sea como paciente control ( sometida a una interrupción voluntaria del embarazo) o como un caso de embarazo ectópico. El hecho de participar supone que acepta donar un pequeño fragmento de tejido embrionario de su gestación. El tejido actualmente no tiene ningún destino específico, siendo finalmente incineradas. Este sólo va a ser utilizado para estudiar sus características morfológicas y de expresión génica y proteica. 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 el tejido 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.

### **Si participa en el estudio:**

Se recogerá el fragmento de tejido embrionario necesario para el estudio, y el resto seguirá su curso normal, bien envió a anatomía patológica o bien se desechará.

### **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 de placentación anómala que ayuden a clarificar el diagnóstico. También podría ayudar a diagnosticar gestaciones ectópicas (fuera del útero) de forma precoz, siendo necesarias menor número de intervenciones quirúrgicas para su tratamiento.

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 Consejería 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 excepciones<sup>1</sup>, 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 Dra. Olivia Vega Oomen 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 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:

“Descripción y comparación del perfil de expresión del sistema LIN 28/Let -7 y micrnas asociados en tejido placentario sano y tejido placentario procedente de embarazo 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. Olivia Vega Oomen. 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:

